

**Transformierende Ereignisse im
Hodgkin-Lymphom
und in
Non-Hodgkin-Lymphomen**

**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.**

**des Fachbereichs
Biologie und Geografie
an der
Universität Duisburg-Essen**

**vorgelegt von
Roland Schmitz**

**aus Bensberg
Juni 2008**

1. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Küppers

2. Gutachter: Prof. Dr. Bertram Opalka

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: PD Dr. Daniel Hering

Tag der Disputation: 17. September 2008

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Genetik der Universität Köln und am Institut für Zellbiologie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

Abkürzungsverzeichnis:

ABC-DLBCL	<i>in vivo</i> -aktiviertes B-Zell-ähnliches DLBCL
AID	aktivierungs-induzierte Cystidin-Deaminase
B-CLL	B-Zell-chronische lymphozytische Leukämie
BCR	B-Zellrezeptor
BL	Burkitt-Lymphom
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
cHL	klassisches Hodgkin-Lymphom
CSR	Klassenwechselrekombination
D	Diversitäts-Genelement des Immunglobulin-Locus
DISC	Zelltod-induzierender-Signalkomplex
DLBCL	Diffus-großzelliges-B-Zell-Lymphom
EBV	Epstein-Barr-Virus
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FL	Follikuläres Lymphom
GC	Keimzentrum
GC-DLBCL	Keimzentrums-ähnliches DLBCL
HL	Hodgkin-Lymphom
HRS	Hodgkin/Reed-Sternberg
Ig	Immunglobulin
J	Verbindendes-Genelement des Immunglobulin-Locus
kb	Kilo Basenpaare
LDI-PCR	Langstrecken-Inverse-Polymerase-Kettenreaktion
mbr	Hauptbruchpunkt-Region
mcr	Nebenbruchpunkt-Region
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	Boten-RNA
mtc	Haupttranslokations-Cluster
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NLPHL	nodulär Lymphozyten-prädominantes Hodgkin-Lymphom
PBMC	peripheres Blut aus mononukleären Zellen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RSS	Rekombinations-Signal-Sequenzen
RT	Reverse Transkription
TCR	T-Zell-Rezeptor
TNFR	Tumornekrosefaktorrezeptor
V	Variables-Genelement des Immunglobulin-Locus

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Biologische und immungenetische Aspekte der B-Lymphozytenentwicklung	1
1.1.1 Frühe B-Zellentwicklung	2
1.1.2 Erweiterung der Antikörpervielfalt im Keimzentrum (GC)	3
1.2 Biologie und Pathogenese von B-Zell-Lymphomen	5
1.3 B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome (B-NHL)	8
1.3.1 Das Diffus-großzellige-B-Zell-Lymphom (DLBCL)	8
1.3.2 Das Follikuläre Lymphom (FL)	9
1.3.3 B-Zell-chronische lymphozytische Leukämie (B-CLL)	10
1.3.4 Das Mantel-Zell-Lymphom (MCL)	10
1.3.5 Das Burkitt-Lymphom (BL)	11
1.4 Hodgkin-Lymphom (HL)	11
1.4.1 Phänotyp von HRS-Zellen	11
1.4.2 Ursprung und Klonalität von HRS-Zellen	12
1.4.3 Verlust des B-Zell-Phänotyps von HRS-Zellen	13
1.4.4 Deregulierte Signalwege im HL	14
1.4.5 Genetische Läsionen in HRS-Zellen	16
1.4.6 Zelluläre Interaktion von HRS-Zellen	17
1.4.7 Epstein-Barr-Virus (EBV)	18
1.4.8 Etablierung von HL-Zelllinien	19
1.5 Zielsetzung der Arbeit	19
 2. Material und Methoden	 21
2.1 Material	21
2.1.1 Chemikalien, Puffer, Enzyme	21
2.1.2 Kits	21
2.1.3 Plasmidvektoren	21
2.1.4 Lentiviren	22
2.1.5 Antikörper	22
2.1.6 Oligonukleotide	22

2.2 Methoden	26
2.2.1 DNA-Arbeitstechniken	26
2.2.1.1 DNA-Präparation	26
2.2.1.2 DNA-Konzentrationsbestimmung	26
2.2.1.3 LDI-PCR zur Analyse von IgH-assoziierten Translokationen	27
2.2.1.4 PCR-Bedingungen	28
2.2.1.5 Elektrophoretische Trennung von DNA	29
2.2.1.6 Elution von DNA aus Agarosegelen	29
2.2.1.7 Reinigung von PCR-Produkten aus Reaktionsansätzen mittels Silica-Zentrifugen-Säulen	29
2.2.1.8 Sequenzreaktion und Auswertung	30
2.2.1.9 Restriktionsspaltung	31
2.2.1.10 Auffüllen und Verdau von 5'- bzw. 3'-überhängenden Enden	31
2.2.1.11 DNA-Dephosphorylierung	31
2.2.1.12 Ligation von DNA zur Klonierung	31
2.2.1.13 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> -Bakterien (Mini-Präparation)	32
2.2.1.14 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> -Bakterien (Maxi-Präparation)	32
2.2.1.15 DNA-Transformation durch Hitzeschock	32
2.2.2 RNA-Arbeitstechniken	33
2.2.2.1 RNA-Präparation	33
2.2.2.2 RNA-Konzentrationsbestimmung	33
2.2.2.3 Reverse Transkription	33
2.2.2.4 Quantitative PCR (qPCR)	34
2.2.3 Protein-Arbeitstechniken	34
2.2.3.1 Gesamtzellextrakt-Generierung	34
2.2.3.2 Protein-Konzentrationsbestimmungen	34
2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	35
2.2.3.4 <i>Western-Blotting</i>	35
2.2.3.5 Immundetektion	35
2.2.3.6 Herstellung von Gewebeschnitten	36
2.2.3.7 Immunfärbung von Gewebeschnitten	36
2.2.3.8 Mikrodissektion mittels <i>Laser Microbeam Microdissection</i> (LMM) und <i>Laser Pressure Catapulting</i> (LPC)	36
2.2.3.9 Gewinnung von peripherem Blut aus mononukleären Zellen (PBMC) mittels Ficoll-Dichtezentrifugation	37

2.2.4 Zellkultur und Transfektionen	38
2.2.4.1 Kultivierung von Zellen	38
2.2.4.2 Zellzahlbestimmung	38
2.2.4.3 Durchflusszytometrische Analyse und Sortierung von Zellen (FACS)	38
2.2.4.4 Ermittlung der Puromycin-Konzentrationen zur Selektion von Zelllinien	39
2.2.4.5 Transfektion von Lymphom-Zelllinien mittels des Amaxa Nucleofektions-Systems	39
2.2.5 Lentivirale Arbeitstechniken	40
2.2.5.1 Erzeugung lentiviraler Ausprägungsplasmide	40
2.2.5.2 Virusproduktion	41
2.2.5.3 Virustitration	41
2.2.5.4 Ultrazentrifugation	41
2.2.5.5 Infektion	42
3. Ergebnisse	43
3.1. Molekulare Charakterisierung von Ig-assoziierten Translokationen im cHL	43
3.1.1 Analyse der chromosomalen Translokation t(10;14) (q11;q32) in der HL-Zelllinie L-1236	43
3.1.2. Molekulare Charakterisierung IgH-assoziiierter Translokationen in primären HRS-Zellen	48
3.2. Gemeinsame und separate transformierende Ereignisse in klonal verwandten Kombinationslymphomen	51
3.2.1 IgH-assoziierte Translokationen in Kombinationslymphomen aus HL und FL sowie HL und MCL	53
3.2.2 Mutationsanalyse der Tumorsuppressorgene FAS und NFKBIA ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$) in HL und NHL der untersuchten Kombinationslymphome	57
3.2.3 Mutationsanalyse des Tumorsuppressorgens TP53 in HL und NHL ausgewählter Kombinationslymphome	58
3.3 Suche nach Tumorsuppressorgenen im HL und NHL	60
3.3.1 Mutationsanalyse des NFKBIA ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$)-Gens in <i>in vitro</i> -aktivierten B-Zell-ähnlichen DLBCL	60
3.3.2 Mutationsanalyse des BAD-Gens in HL und NHL	64

3.3.3	Mutationsanalyse der Gene CASP10, CASP8 und FADD in HRS-Zellen	66
3.3.4	Identifikation des TNFAIP3 (A20)-Gens als Tumorsuppressorgen im HL und PMBL	68
3.3.4.1	Genetische Hinweise auf eine Tumorsuppressorgen-Rolle für TNFAIP3 im HL und PMBL	68
3.3.4.2	Funktionelle Untersuchungen zur Bedeutung von TNFAIP3-Mutationen in HL-Zelllinien	79
4.	Diskussion	93
4.1.	Molekulare Charakterisierung von Ig-assoziierten Translokationen im cHL	93
4.2	Gemeinsame und separate transformierende Ereignisse in klonal verwandten Kombinationslymphomen	95
4.3.	Suche nach Tumorsuppressorgen im HL und NHL	99
4.3.1	Mutationsanalyse des NFKBIA ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$)-Gens in <i>in vitro</i> -aktivierten B-Zell-ähnlichen DLBCL	99
4.3.2	Mutationsanalyse des BAD-Gens in HL und NHL	101
4.3.3	Mutationsanalyse der Gene CASP10, CASP8 und FADD im HL	102
4.3.4	Identifikation des TNFAIP3 (A20)-Gens als Tumorsuppressorgen im HL und PMBL	104
5.	Zusammenfassung	109
6.	Literatur	110
	Teilpublikationen	119

1. Einleitung

Das Immunsystem des Menschen hat diverse Mechanismen zur Erkennung und Inaktivierung von Pathogenen wie Viren, Bakterien, Pilzen oder anderen körperfremden Substanzen entwickelt. Neben der angeborenen Immunität zur unspezifischen Eliminierung von Pathogenen z.B. durch phagozytierende Zellen spielt die spezifische adaptive Immunantwort eine wesentliche Rolle bei der Bekämpfung verschiedenster Infektionen. Das adaptive Immunsystem wird neben antigenpräsentierenden Zellen maßgeblich durch zwei Gruppen von Zellen repräsentiert: Die B- und T-Lymphozyten, die auch B- und T-Zellen genannt werden. T-Zellen erkennen Antigene über den an der Zelloberfläche verankerten T-Zell-Rezeptor (TCR) indirekt in Form prozessierter Peptide, die ihnen von anderen Zellen mittels des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC-Komplex) präsentiert werden. T-Zellen werden nach ihrer Funktion unterschieden in zytotoxische T-Zellen zur Erkennung und Eliminierung von Zellen, die Fremd-Antigene an ihrer Zelloberfläche präsentieren, T-Helferzellen, die unter anderem an der Stimulation und Induktion von B-Zellen beteiligt sind, und regulatorische T-Zellen, die die T-Zell-Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen realisieren. B-Zellen erkennen freie und membranständige Antigene direkt über von ihnen produzierte Immunglobuline (Ig), die entweder in Form von sezernierten Antikörpern oder als B-Zellrezeptor (BCR) auf der Oberfläche der Zellen existieren können.

Je nach beteiligtem Zelltyp werden Immunreaktionen unterschieden in humoral und zellulär-vermittelte Immunität. In der B-Zell-vermittelten, T-Zell-unabhängigen und in der T-Zell-abhängigen Immunantwort kommt es zur Bildung von Antikörpern durch B-Zellen. T-Zell-abhängige Immunreaktionen sind gekennzeichnet durch die antigen-spezifischen Interaktionen zwischen B- und T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen, in dessen Folge es zur Generierung von B-Zellen mit hochaffinen Antikörpermolekülen kommt.

1.1 Biologische und immungenetische Aspekte der B-Lymphozytenentwicklung

B-Lymphozyten entwickeln sich in der fötalen Leber und im adulten Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen. Induziert durch verschiedene Differenzierungssignale aus der Mikroumgebung des Knochenmarks durchlaufen diese Zellen die

frühen Stadien der B-Zellentwicklung bis hin zur reifen B-Zelle, die dann mit einem funktionellen, nicht autoreaktiven BCR in die Peripherie auswandern (Rajewsky 1996). Trifft eine reife, antigen-unerfahrene B-Zelle in der T-Zellzone der peripheren lymphoiden Organe mit ihrem BCR auf ein passendes Antigen, wird diese bei gleichzeitiger Co-Stimulation durch T-Helferzellen aktiviert. So aktivierte B-Zellen entwickeln sich entweder zu kurzlebigen Antikörper-sezernierenden Plasmablasten, oder bilden durch intensive Proliferation bei gleichzeitiger Einwanderung anderer Zellen Keimzentren (GC). Hier finden Affinitätsreifung und Klassenwechsel (CSR) des BCR statt, in deren Folge sich Antikörper-sezernierende Plasmazellen oder Gedächtnis-B-Zellen entwickeln (MacLennan 1994).

1.1.1 Frühe B-Zellentwicklung

Die Stadien der frühen B-Zellentwicklung sind gekennzeichnet durch schrittweise Umlagerungsprozesse der Ig-Gene, beginnend mit den Ig-Schwerkettengenen (IgH): Im ersten Schritt wird eines der Diversitäts-(D)- mit einem Verbindungs-(J)-Gensegment verknüpft, an die im zweiten Schritt ein Variables-(V)-Gensegment gefügt wird. Daran anschließend erfolgt die Umlagerung der Leichtketten-Gensegmente, die – sofern funktionell – zur Ausprägung eines kompletten Immunglobulinmoleküls auf der Oberfläche der Zelle führt (Gellert 2002).

Als Erkennungsstellen der V(D)J-Rekombination dienen die Rekombinations-Signal-Sequenzen (RSS), die jedem V-, D-, und J-Gensegment benachbart liegen und aus hoch konservierten Heptamer- und Nonamer-Sequenzen bestehen, die durch 12 oder 23 Basenpaare umfassende, nicht konservierte Sequenzen, so genannte *Spacer*, von einander getrennt sind. Während des Rekombinationsprozesses werden diese RSS von den lymphoid-spezifischen Proteinen RAG1 und RAG2 (*recombination activating gene*) kooperativ erkannt und zwischen Heptamer- und codierender Sequenz geschnitten (Gellert 2002). Die entstehenden codierenden Enden bilden katalysiert durch die RAG-Proteine über kovalente Verbindungen des 3'-Terminus und des 5'-Terminus Haarnadelstrukturen (McBlane et al. 1995). An der Auflösung der Haarnadelstrukturen und der Verbindung der V-, D- und J-Gensegmente sind verschiedene Faktoren beteiligt, wie zum Beispiel DNA-abhängige Proteinkinase, Ku 70/80 und Artemis, die auch zur DNA-Doppelstrangbruchreparatur beitragen (Gellert 2002; Ma et al. 2002). Dabei kann es an den Verknüpfungsstellen durch Exonukleaseaktivität zum Verlust einzelner Nukleotide und durch die Terminal-

Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) zur Addition nicht keimbahn-codierter N- (*non-templated*)-Nukleotide kommen. Hinzufügung von P- (*palindromic*)-Nukleotiden entsteht, wenn die Haarnadelstruktur nicht exakt in der Mitte aufgelöst wird, und die überstehenden Enden durch komplementäre Basenpaarung aufgefüllt werden.

Das Endprodukt der erfolgreichen V(D)J-Rekombination codiert für die Antigenbindungsstelle des Immunglobulinmoleküls einer B-Zelle. Die enorm großen Kombinationsmöglichkeiten der verschiedenen V-, (D-), und J-Gensegmente und die beschriebenen Veränderungen an den Verbindungsstellen in der Gesamtheit aller B-Zellen ermöglichen die Ausprägung eines breiten Repertoires von unterschiedlichen Antikörpern verschiedener Spezifitäten. V(D)J-Umlagerungen (IgV-Gene) lassen sich aus den genannten Gründen auch als klonale Marker für B-Zellen verwenden.

1.1.2 Erweiterung der Antikörpervielfalt im Keimzentrum (GC)

GC sind histologische Strukturen in peripheren lymphoiden Organen, wie Lymphknoten, Milz oder Tonsillen, die aus proliferierenden B-Zellen entstehen. Dies sind die Orte der somatischen Hypermutation (SHM) der IgV-Gene, die die Affinität des B-Zell-Rezeptors für das Antigen steigert (Berek et al. 1991; Jacob et al. 1991; Küppers et al. 1993). Im Verlauf dieses Prozesses werden Punktmutationen und zu 5-10% Insertionen und Deletionen eingeführt (Goossens et al. 1998; Teng und Papavasiliou 2007). Die somatische Hypermutation erfolgt bevorzugt an bestimmten Sequenzmotiven, bestehend aus DGYW, wobei D für Adenin (A), Guanin (G) oder Thymin (T), Y für Cytosin (C) oder Thymin und W für Adenin oder Thymin stehen kann (Rogozin und Diaz 2004). Die somatische Hypermutation ist transkriptionsabhängig und findet überwiegend auf einem DNA-Bereich ca. 1 kb beginnend mit dem Transkriptionsstart statt (Lebecque und Gearhart 1990; Fukita et al. 1998; Storb et al. 1998). Wie Studien vor wenigen Jahren zeigen konnten, ist die aktivierungs-induzierte Cytidin Deaminase (AID) für diesen Mechanismus essentiell (Muramatsu et al. 2000; Revy et al. 2000). Dieses Enzym initiiert die somatische Hypermutation durch die Desaminierung von Deoxycytidin-Resten der DNA. Die dadurch entstehenden Uracil-Reste in einem der DNA-Stränge werden durch direkte Replikation oder durch die Uracil-DNA-Glykosylase unter Einführung von Mutationen beseitigt. An der inkorrekten Auflösung dieser Läsionen wirken außerdem DNA-Fehlbasenpaarungs-Reparatursysteme wie der MSH2/MSH6-Komplex zusammen mit fehlerbehafteten DNA-Polymerasen mit (Di Noia und Neuberger 2007). Die somatische Hypermutation lässt sich in GC- oder

Post-GC-B-Zellen nicht nur in IgV-Genen nachweisen. So wurden sie in diesen Zellen auch in Nicht-Ig-Genen nachgewiesen, die scheinbar nach dem gleichen Muster entstehen. Ebenso wie bei der somatischen Hypermutation in IgV-Genen sind diese Mutationen transkriptionsabhängig, treten bevorzugt in DGYW-Sequenzmotiven auf und lassen sich bis zu 1 kb stromabwärts der Transkriptionsstellen finden (Gordon et al. 2000; Pasqualucci et al. 2001; Liu et al. 2008).

Einige GC-B-Zellen erfahren daneben weitere Veränderungen ihrer IgH-Gene: den angesprochenen Klassenwechsel, bei dem das konstante Gensegment IgM durch IgG, IgA oder IgE ersetzt wird. Dies verändert die Effektorfunktion des Antikörpermoleküls (Manis et al. 2002). Wie auch für die somatische Hypermutation ist AID für den Klassenwechsel essentiell (Muramatsu et al. 2000; Revy et al. 2000), der genaue Mechanismus jedoch wenig verstanden. Während des Klassenwechsels kommt es AID-abhängig in zwei der jeweils 5' eines konstanten Gensegments gelegenen Switch-Regionen zu Doppelstrangbrüchen. Diese werden unter Deletion des dazwischen liegenden Sequenzabschnitts miteinander verbunden, sodass ein flussabwärts gelegenes konstantes Gensegment in die Nähe der VDJ-Umlagerung gelangt (Wuerffel et al. 1997; Schrader et al. 2005; Zarrin et al. 2007). In den entstehenden Fusionen der beiden Switch-Regionen lassen sich (wahrscheinlich AID induzierte) Punktmutationen identifizieren. Die 1-10 Kilobasen umfassenden Switch-Sequenzen besitzen ein hohes Maß an häufig GC-reichen, palindromischen Abschnitten. Die Rekombination der konstanten Gensegmente erfolgt nicht wie bei der V(D)J-Rekombination an bestimmten Sequenzmotiven, sondern an palindromischen Bereichen, die in den Switch-Regionen verteilt liegen (Tashiro et al. 2001). Über welchen Mechanismus AID an dieses Ziel gelangt, ist unklar. Der Klassenwechsel ist abhängig von Keimbahntranskription durch den Switch-Locus und benötigt die Integrität der 3' der konstanten Gene gelegenen Ig-Enhancer (Jung et al. 1993; Zhang et al. 1993; Bottaro et al. 1998). Diese Switch-Transkripte bilden RNA-DNA-Hybride, so genannte R-Schleifen, aus, die so möglicherweise den Zugang von AID auf dem verdrängten Strang ermöglichen (Chaudhuri et al. 2003; Ramiro et al. 2003; Yu et al. 2005).

1.2. Biologie und Pathogenese von B-Zell-Lymphomen

Maligne Lymphome sind monoklonale Neoplasien aus Lymphozyten. In der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) werden Lymphome in Hodgkin- (HL) und Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) unterteilt. Innerhalb der NHL unterscheidet man zwischen T-Zell-, NK-Zell- und B-Zell-Lymphomen, die weitergehend nach ihrer Herkunft in Vorläufer- und periphere Lymphome unterteilt werden. Kriterien der Klassifikation sind morphologische Merkmale, der immunhisto-chemische Phänotyp und häufig vorkommende gemeinsame genetische Läsionen (Jaffe et al. 2001).

Der bei weitem größte Teil aller Lymphome weist einen B-Zell-Ursprung auf. Wie durch den Nachweis von somatisch mutierten IgV-Genen gezeigt werden konnte, stammt die Mehrheit aller B-NHL von GC- oder Post-GC-B-Zellen ab (Klein und Dalla-Favera 2008). Darüber hinaus scheint das GC bei der Pathogenese dieser Lymphome eine entscheidende Rolle zu spielen. In einigen B-Lymphomen ist der Prozess der somatischen Hypermutation noch aktiv, was auf die Abstammung von GC-B-Zellen und überdies auf die Transformation ihrer Ursprungszellen im GC hinweist. Der Befund klonal verwandter Kombinationslymphome bestehend aus HL und NHL mit gemeinsamen und separaten somatischen Mutationen in den IgV-Genen der beiden Lymphome ist ein weiteres Indiz für die Transformation der Vorläufer-Zellen dieser Lymphome im GC (Bräuninger et al. 2006).

Zentroblasten, die proliferierenden GC-B-Zellen, in denen somatische Hypermutation stattfindet, weisen mit ca. 6-12 h eine dramatisch kurze Zellzyklus-dauer auf (Allen et al. 2007; Schwickert et al. 2007). Interessanterweise reagieren GC-B-Zellen auf den damit verbundenen genotoxischen Stress mit einer Unterdrückung des DNA-schadigungsabhängigen Zellzyklusstopps und Apoptose. Diese (kurzzeitige) Toleranz von DNA-Schädigungen in GC-B-Zellen wird realisiert durch die Ausprägung des für die Differenzierung von GC-B-Zellen essentiellen transkriptionellen Repressors BCL6 und ermöglicht so extreme Proliferationsraten im GC (Phan und Dalla-Favera 2004; Phan et al. 2005; Phan et al. 2007). Andererseits sind GC-B-Zellen jedoch stark apoptoseanfällig. So prägen GC-B-Zellen den Apoptose-Initiator FAS (CD95) aus, was eine schnelle Elimination von GC-B-Zellen ermöglicht (Takahashi et al. 2001). Anders als naive B-Zellen prägen GC-B-Zellen nicht den anti-apoptotischen Faktor BCL2 aus (MacLennan 1994; Klein et al. 2003). *In vitro* begehen GC-B-Zellen spontan Apoptose, sofern sie nicht durch anti-apoptotische Signale, wie z.B. CD40-Stimulation gerettet werden (Liu et al. 1989; Feuillard et al.

1995). *In vivo* scheint die Stimulation des CD40-Rezeptors auf GC-B-Zellen durch CD154 (CD40-Ligand) auf T-Zellen beim Austritt der Zentroblasten aus dem Proliferationszyklus eine entscheidende Rolle zu spielen (Klein und Dalla-Favera 2008). CD40-Stimulation bewirkt die Aktivierung des Transkriptionsfaktorkomplexes NF- κ B, welcher unter anderem die Ausprägung zahlreicher anti-apoptotischer Gene kontrolliert (Hayden und Ghosh 2008).

Einen wesentlichen Beitrag zur Entstehung von Lymphomen im GC leisten auf der einen Seite die durch hohe Proliferationsraten bedingten DNA-Schädigungen, die z.B. inaktivierende Mutationen in Tumorsuppressorgenen, chromosomale Amplifikationen oder Deletionen verursachen können. Andererseits bergen die Prozesse der somatischen Hypermutation und des Klassenwechsels erhebliche Risiken, die zur Transformation einer GC-B-Zelle führen können. Bestätigung findet die Hypothese in den Befunden aus Experimenten mit AID-defizienten Mäusen (Ramiro et al. 2004; Dorsett et al. 2007; Pasqualucci et al. 2008). So konnte durch die Kreuzung dieser Mäuse mit Mäusen aus verschiedenen GC- oder Post-GC-Lymphom-Maus-Modellen gezeigt werden, dass das Auftreten dieser Lymphome bei Abwesenheit von AID drastisch reduziert war. Ferner fehlen in diesen so erzeugten AID-defizienten Mäusen die in den Lymphom-Maus-Modellen charakteristischen, onkogenen Ig-MYC-Translokationen. Diese Studien untermauern die über 20-jährige Annahme, dass chromosomale Translokationen in zahlreichen B-Zell-NHL im Rahmen eines fehlerhaften Klassenwechsels stattfinden. Demnach finden sich zahlreiche Beispiele Ig-assoziiierter chromosomaler Translokationen mit Bruchpunkten in Switch-Regionen (Showe et al. 1985; Shiramizu und Magrath 1990; Fenton et al. 2002; Fenton et al. 2004). AID-induzierte DNA-Doppelstrangbrüche in IgV-Genen treten auch während der somatischen Hypermutation auf, die, sofern mit gleichzeitig auftretenden DNA-Doppelstrangbrüchen eines anderen Chromosoms verbunden, zu chromosomalen Translokationen führen können (Küppers und Dalla-Favera 2001). Beispiele hierfür ließen sich in Zellen des Burkitt-Lymphoms (BL) identifizieren, aus denen Bruchpunkte in rearrangierten V-Genen der Leichtkette kloniert wurden (Klobeck et al. 1987; Cario et al. 2000). Ein weiteres Indiz für die Beteiligung der (aberranten) somatischen Hypermutation an Ig-assoziierten Translokationen sind die häufig auftretenden Translokationsbruchpunkte im BCL6-Gen, das entweder mit Ig-Genen oder Nicht-Ig-Genen fusioniert sein. Viele dieser Nicht-Ig-Gene sind, wie auch BCL6, Ziele der aberranten somatischen Hypermutation (Akasaka et al. 2000; Pasqualucci et al.

2001; Klein und Dalla-Favera 2008; Liu et al. 2008). Ferner stimmen die Regionen der BCL6-Translokationsbruchpunkte und der Regionen der aberranten somatischen Hypermutation in diesem Gen häufig überein (Akasaka et al. 2000; Lossos et al. 2001).

Neben der genetischen Veränderung der Ig-Gene im GC lassen sich schon während der frühen B-Zell-Entwicklung im Knochenmark Mechanismen entdecken, die zu onkogenen Translokationen in B-Zelllymphomen führen: In nahezu allen Fällen des Mantel-Zell-Lymphoms (MCL) lässt sich mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung die für diese Entität typische Ig-assoziierte BCL1-Translokation nachweisen (Jares et al. 2007). Daraus resultiert bis auf seltene Ausnahmen die Verbindung des BCL1-Locus mit einer DHJH-Gensegmentverknüpfung des IgH-Locus auf Chromosom 14q32 (Welzel et al. 2001). Ein ähnliches Bild zeigt sich bei der Ig-assoziierten BCL2-Translokation, die in 90% der Fälle des Follikulären Lymphoms (FL) zu finden ist (Bende et al. 2007). Hier ist der BCL2-Locus auf Chromosom 18 häufig ebenfalls mit einer DHJH-Gensegmentverknüpfung fusioniert. Die Bruchpunkte dieser Translokationen liegen dabei direkt an der Grenze zwischen RSS und JH bzw. DH. Der Verlust von Nukleotiden bzw. die Addition von N-Nukleotiden an diesen Bruchpunkten, wie sie für die VDJ-Rekombination charakteristisch sind, ist ein weiteres Indiz für eine mögliche Beteiligung einer fehlerhaften (V)DJ-Rekombination (Küppers und Dalla-Favera 2001). Der Befund, dass die Translokationsbruchpunkte im BCL2- und BCL1-Gen-Locus dieser wiederkehrenden Translokationen gehäuft in bestimmten Regionen stattfinden – den Hauptbruchpunkt-Regionen (*mbr*) bzw. den Haupttranslokations-Clustern (*mtc*) –, weist auf einen zielführenden Mechanismus während der (V)DJ-Rekombination hin.

Die Konsequenz der geschilderten Translokationen in den Ig-Locus ist die transkriptionelle Deregulation der translozierten Gene. Im MCL lässt sich eine starke Ausprägung von Cyclin D1, codiert vom BCL1-Gen, feststellen. Verantwortlich hierfür scheinen regulatorische Elemente des Ig-Locus zu sein. In Fällen von IgH-assoziierten MYC-Translokationen konnten die 3'-Enhanceraktivität des IgH-Locus und das Expressionsniveau von MYC miteinander korreliert werden (Jain et al. 1993; Sandlund et al. 1993). In Fällen des Diffus-großzelligen B-Zell-Lymphoms ließen sich als Konsequenz einer BCL6-Translokation IgH-BCL6-Fusionstranskripte nachweisen, die in IgH-Promotoren initiiert wurden, was die Deregulation durch Promotor-Substitution demonstriert (Ye et al. 1995). Neben der verstärkten Ausprägung als

Folge des Einflusses transkriptioneller Elemente der Ig-Loci spielt der Verlust der Regulierbarkeit der Gene eine wesentliche Rolle. Die Ausprägung von BCL6 in GC-B-Zellen steht aus den oben genannten Gründen unter strenger Kontrolle (Klein und Dalla-Favera 2008). Beim FL liegt die Vermutung nahe, dass konstitutive BCL2-Ausprägung infolge der Translokation einer möglichen Vorläufer-Zelle im Keimzentrumsstadium vor Apoptose bewahrt und somit weitere genetische Läsionen ermöglicht.

1.3 B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome (B-NHL)

Zu den am weitesten verbreiteten Lymphomen unter den B-NHL gehören neben anderen Entitäten das Diffus-großzellige-B-Zell-Lymphom (welches etwa 30% aller Lymphome ausmacht), das Follikuläre Lymphom (22%), die B-Zell-Chronische lymphozytische Leukämie (7%), das Mantel-Zell-Lymphom (6%) und das Burkitt-Lymphom, das fast ausschließlich bei Kindern und jungen Erwachsenen vorkommt und in dieser Gruppe einen Anteil von 35% ausmacht (Fisher 2003).

1.3.1 Das Diffus-großzellige-B-Zell-Lymphom (DLBCL)

Das DLBCL repräsentiert ein klinisch und biologisch heterogenes Lymphom und ist mit etwa 30% das häufigste aller B-NHL (Fisher 2003). Wesentliche Fortschritte im Verständnis der Biologie und Klinik des DLBCL wurden in den letzten Jahren durch globale Genausprägungsstudien erreicht. So gelang es mit dieser Methode, mindestens zwei Untergruppen zu differenzieren, die sich bezüglich ihres Genausprägungsmusters und des klinischen Verlaufs in retrospektiven Studien wesentlich unterscheiden (Alizadeh et al. 2000; Rosenwald et al. 2002; Monti et al. 2005). Aus dem Vergleich der Genausprägungssignaturen mit nicht-transformierten B-Zellen wurde deutlich, dass eine der beiden Gruppen zahlreiche Gene, die für GC-B-Zellen spezifisch sind, ausprägen. Die andere Gruppe der DLBCL offenbarte dagegen in ihrem Genausprägungsmuster starke Ähnlichkeiten zu *in vitro* aktivierten B-Zellen. Letztere Gruppe, die eine schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit aufwies, zeichnet sich ferner durch die konstitutive Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B aus. Ebenso wie in den Genausprägungsmustern unterscheiden sich beide Untergruppen auch in den in ihnen identifizierten genetischen Läsionen. So lassen sich Ig-assoziierte BCL2-Translokationen und Amplifikationen des REL-Gens vornehmlich in GC-B-Zell-ähnlichen DLBCL identifizieren (Rosenwald et al. 2002). Interessanterweise

finden sich BCL6-Translokationen mit verschiedenen Translokationspartnern gehäuft im ABC-DLBCL (Iqbal et al. 2007). Dies steht im Gegensatz zum Gen-Ausprägungsmuster beider Untergruppen, was sich auf den GC-B-Zell-ähnlichen Subtyp beschränkt. Beide Untergruppen weisen somatisch mutierte Ig-V-Gene auf, wobei GC-DLBCL aktive somatische Hypermutation zeigen (Lossos et al. 2000). Somatische Mutationen in den Genen des apoptose-vermittelnden Rezeptors FAS und den in Zellantworten auf DNA-Schäden involvierten Faktoren ATM und p53 wurden in seltenen Fällen identifiziert (Volpe et al. 1996; Gronbaek et al. 1998; Stankovic et al. 2002). Diese genetischen Läsionen wurden bislang noch nicht differenziell nach Subtyp untersucht.

Ein seltener Subtyp des DLBCL stellt das nach der Lokalisation benannte primär mediastinale B-Zell-Lymphom dar. Globale Genexpressionsstudien dieses Lymphoms wiesen innerhalb der DLBCL auf eine Ähnlichkeit zur ABC-DLBCL-Untergruppe hin. Noch größere Ähnlichkeit zeigt das PMBL jedoch zum Hodgkin-Lymphom (HL) (Rosenwald et al. 2003; Savage et al. 2003). Wie das HL und der ABC-DLBCL-Subtyp zeigt auch dieses Lymphom konstitutive NF- κ B-Aktivität. Das PMBL weist häufig BCL6-Translokationen und Amplifikationen des REL-Locus' auf (Joos et al. 1996; Iqbal et al. 2007). Außerdem sind somatische SOCS1-Mutationen und JAK2-Genlocus-Amplifikationen im PMBL beschrieben (Melzner et al. 2005; Weniger et al. 2007).

1.3.2 Das Follikuläre Lymphom (FL)

Das FL repräsentiert ca. 20% aller B-Zell-NHL (Fisher 2003). Es gehört zu den indolenten (langsam wachsenden) Lymphomen, transformiert jedoch in ca. einem Drittel der Fälle nach einigen Jahren zu einem aggressiven Lymphom (z.B. DLBCL) (Bende et al. 2007). Das FL stammt von GC-B-Zellen ab: Die Lymphomzellen besitzen somatisch mutierte Ig-V-Gene und weisen eine aktive somatische Hypermutation auf, die in intraklonaler V-Gen-Diversität resultiert (Bahler und Levy 1992). Zudem zeigt das FL typischerweise ein follikuläres Wachstumsverhalten und scheint von Signalen abhängig zu sein, die von den reaktiven nicht-malignen Zellen abgegeben werden (Su et al. 2001). Ein gemeinsames Merkmal fast aller FL ist die Ig-assoziierte Translokation des BCL2-Gens im Verlauf einer fehlerhaften (V)DJ-Umlagerung zu einem frühen Zeitpunkt in der B-Zellentwicklung oder in selteneren Fällen auch im GC im Verlauf eines fehlerhaften Klassenwechsels (Bende et al.

2007). Deregulierte Ausprägung von BCL2 in GC-Zellen ermöglicht es wahrscheinlich den Vorläufer-Zellen des FL, die Selektion im GC zu überleben. Befunde von Ig-assoziierten BCL2-Translokationen in B-Zellen gesunder Patienten deuten darauf hin, dass dies nicht das einzige transformierende Ereignis in FL-Zellen ist (Limpens et al. 1991). Ein weiteres, vermutlich im Lauf der GC-Reaktion erworbenes transformierendes Ereignis ist bislang nicht bekannt.

1.3.3. Die B-Zell-chronische lymphozytische Leukämie (B-CLL)

Die B-CLL ist die häufigste Leukämie der westlichen Welt mit einer Inzidenz von 1 pro 100 000 im Jahr. Etwa die Hälfte aller B-CLL weisen somatisch mutierte Ig-V-Gene auf, was auf eine Abstammung von GC-B oder Post-GC-B-Zellen schließen lässt, die restlichen B-CLL zeigen unmutierte IgV-Gene (Klein und Dalla-Favera 2005). Diese Subgruppen der B-CLL haben unterschiedliche Prognosen; unmutierte B-CLL zeigen ein aggressiveres Verhalten als die mutierten Fälle (Damle et al. 1999).

In B-CLL findet sich in häufigen Fällen eine Deletion der chromosomalen Region 13q14. Dies ist der Genlocus der microRNAs miR-15a/16-1, deren Ausprägung in B-CLL in der Mehrzahl der Fälle fehlt (Calin et al. 2002). Diese microRNA sind an der Regulation der Ausprägung des BCL2-Gens beteiligt (Cimmino et al. 2005). Neben diesen genetischen Läsionen weisen B-CLL in einigen Fällen Mutationen der Gene TP53 und ATM auf, deren Genprodukte z.B. an Zellantworten auf DNA-Schäden beteiligt sind (Gaidano et al. 1991; Gummy-Pause et al. 2004).

1.3.4 Das Mantel-Zell-Lymphom (MCL)

Das Mantel-Zell-Lymphom macht ca. 6% aller NHL aus und tritt vorwiegend bei Männern fortgeschrittenen Alters auf. Es zählt zu den aggressiven Lymphomen und ist nur in seltenen Fällen heilbar. Die Tumorzellen des Mantel-Zell-Lymphoms leiten sich von Zellen der Mantelzone des GC ab, in ihnen finden sich in nahezu allen Fällen Ig-assoziierte BCL1-Translokationen. Ferner lassen sich in etwa der Hälfte der MCL ATM-Genmutationen und Deletionen der chromosomalen Bande 13q14, dem Ort der microRNAs miR-15a/16-1, identifizieren.

1.3.5 Das Burkitt-Lymphom (BL)

Das BL wird unterteilt in die endemische und die sporadische Form. Die endemische Form betrifft vornehmlich Kinder und junge Erwachsene in Afrika und ist in mehr als 95% der Fälle mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) assoziiert (Kutok und Wang 2006). Die sporadische Form kommt hauptsächlich in Europa und Nordamerika vor und weist selten eine EBV-Assoziation auf. Das BL stammt von GC-B-Zellen ab. Es prägt das GC-B-Zell-spezifische Protein CD77 und CD10 aus, weist somatisch mutierte IgV-Gene auf und zeigt aktive somatische Hypermutation (Aiello et al. 1990; Chapman et al. 1995). Alle BL weisen chromosomale Translokationen des MYC-Gens mit Beteiligung der Ig-Loci (Hummel et al. 2006) auf. Ferner finden sich in BL häufig Mutationen des TP53-Gens (Gaidano et al. 1991).

1.4. Hodgkin-Lymphom (HL)

Das HL wurde erstmals im Jahr 1832 von Thomas Hodgkin beschrieben (Hodgkin 1832). Ein Merkmal zur Diagnose dieses Lymphoms ist das Auftreten einer geringen Anzahl von großen multinukleären Hodgkin/Reed-Sternberg-(HRS)-Zellen, eingebettet in einem zellulären Infiltrat verschiedener Zelltypen hämatopoetischen Ursprungs. HRS-Zellen machen in der Regel weniger als 1% der Tumormasse aus, während sich die restlichen Zellen aus T-Zellen, B-Zellen, Plasmazellen, Makrophagen, Eosinophilen, Neutrophilen und Mastzellen zusammensetzen (Weiss et al. 2007). Mit Inzidenzraten von 2-4 neuen Fällen pro 100 000 im Jahr ist das HL eines der häufigsten Lymphome in der westlichen Welt (Landgren und Caporaso 2007). Das HL wird ferner unterteilt in klassisches HL (cHL), welches 95% der Fälle ausmacht, und das nodulär Lymphozyten-prädominante HL (NLPHL), das in 5% der Fälle vorliegt (Jaffe et al. 2001). Beim cHL unterscheidet man gemäß Unterschieden in Morphologie und Phänotyp der Zellen und dem histologischen Bild nodulär sklerotisierendes HL, gemischtzelliges HL, lymphozytenreiches HL und lymphozytenarmes HL. Das HL wird derzeit hauptsächlich mit einer Kombination aus Chemo- und Radiotherapie behandelt und ist in 80-90% der Fälle heilbar (Fuchs et al. 2006).

1.4.1 Phänotyp von HRS-Zellen

Die Diagnose des HL geschieht anhand morphologischer Merkmale und vor allem durch den immunhistochemischen Nachweis von CD30, der von allen HRS-Zellen ausgeprägt wird. CD30 gehört der Familie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren

(TNFR) an und wird neben HRS-Zellen in aktivierten Lymphozyten ausgeprägt. HRS-Zellen besitzen einen Immunphänotyp, der sich keinem Zelltyp des hämatopoetischen Systems zuordnen lässt. So zeigt sich z.B. die Koausprägung von T-Zell-spezifischen Proteinen wie Granzym B, CD3 und CD4, gepaart mit dendritischen zellspezifischen Proteinen wie TARC und Fascin, und Granulozyten-spezifischen Proteinen wie CD15 (Takahashi et al. 1995; Oudejans et al. 1996; van den Berg et al. 1999).

1.4.2 Ursprung und Klonalität von HRS-Zellen

Aufgrund des komplexen Immunphänotyps und der Seltenheit der Zellen war die zelluläre Abstammung der Zellen lange Zeit ungeklärt. Dies liegt vor allem darin begründet, dass HRS-Zellen nicht mit Standardmethoden wie *Southern Blot* oder PCR aus Ganzschnittgewebe analysierbar sind. Der Nachweis des B-Zell-Ursprungs wurde erreicht durch die Entwicklung von Methoden zur Isolation einzelner HRS-Zellen und die Etablierung sensitiver PCR-Methoden zur Detektion umgelagerter IgV-Gene (Küppers et al. 1994; Bräuninger et al. 2006). Durch die Demonstration somatisch mutierter IgV-Gene konnte ferner gezeigt werden, dass HRS-Zellen sowie die L&H-Zellen des NLPHL von GC-B-Zellen oder Post-GC-B-Zellen abstammen. L&H-Zellen des NLPHL weisen jedoch, im Gegensatz zu den HRS-Zellen, in einem Teil der Fälle intraklonale Diversität auf (Bräuninger et al. 1997; Marafioti et al. 1997; Küppers et al. 1998). Die aktive somatische Hypermutation in L&H-Zellen deutet auf einer direkten Abstammung dieser Zellen von GC-B-Zellen hin.

HRS-Zellen des cHL zeigen in etwa 25% der analysierten Fälle in ihren IgV-Genen inaktivierende Mutationen, wie Stopp-Codons, Deletionen oder Insertionen, die zur Verschiebung des Leserasters führen (Bräuninger et al. 2006). Da B-Zellen, die die Ausprägung ihres BCR verlieren, normalerweise durch Apoptose eliminiert werden, deutet die Identifikation von destruktiven Mutationen in HRS-Zellen im Verlauf der somatischen Hypermutation auf eine Abstammung von präapoptotischen GC-B-Zellen hin (Kanzler et al. 1996a; Lam et al. 1997; Bräuninger et al. 2006). Interessanterweise finden sich inaktivierende Mutation der IgV-Gene fast ausschließlich in EBV-positiven HL (Bräuninger et al. 2006). Da das von EBV codierte LMP2a-Protein, das in fast allen EBV-positiven HL ausgeprägt wird, die Anwesenheit eines BCR imitieren kann, könnte dies am Überleben BCR-loser HRS-Vorläufer-

Zellen im Keimzentrum beteiligt sein (Caldwell et al. 1998; Bechtel et al. 2005; Mancao und Hammerschmidt 2007).

Ein weiterer Hinweis darauf, dass entscheidende Schritte der Transformation des cHL innerhalb des GC geschehen, sind Befunde klonal verwandter Kombinationslymphome aus HL und NHL. Die IgV-Gene der beiden Lymphome zeigen häufig neben identischer V-Gen-Umlagerungen gemeinsame und separate Mutationen, was die Vermutung nahe legt, dass sich beide Lymphome im GC aus einer gemeinsamen Vorläufer-Zelle entwickelt haben (Küppers 2005). In seltenen Fällen konnten klonale TCR-Genumlagerungen (bei gleichzeitigem Fehlen von Ig-Genumlagerungen) nachgewiesen werden, die auf einen Ursprung von T-Zellen in diesen Fällen hinweisen (Seitz et al. 2000; Müschen et al. 2000b).

1.4.3 Verlust des B-Zell-Phänotyps von HRS-Zellen

Trotz der Abstammung von B-Zellen prägen HRS-Zellen kaum B-Zellspezifische Proteine aus (Schwering et al. 2003). Im Einklang damit fehlen zahlreiche B-Zellspezifische Transkriptionsfaktoren wie z.B. Pu.1, Oct-2 und BOB1, was ein Grund für fehlende Ig-Transkription sein könnte (Re et al. 2001; Stein et al. 2001; Torlakovic et al. 2001). Ein weiterer Grund hierfür könnten epigenetische Mechanismen wie die Methylierung der Promotoren der Ig-Gene sein (Ushmorov et al. 2004). Vor dem Hintergrund des verlorenen B-Zell-Phänotyps scheint es jedoch umso erstaunlicher, dass einer der Hauptregulatoren eines B-Zell-spezifischen Genausprägungsmusters, der Transkriptionsfaktor PAX5, in HRS-Zellen anwesend ist (Foss et al. 1999). Diese Diskrepanz lässt sich nicht durch Mutationen im PAX5-Gen erklären (Schwering et al. 2003). Einer der Gründe könnte in der Anwesenheit des Id2-Proteins liegen, welches lymphoide Entwicklung supprimiert (Yokota et al. 2001; Renne et al. 2006). Des Weiteren prägen HRS-Zellen den T-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktor Notch1 aus, der ebenfalls eine B-Zell-spezifische Entwicklung unterdrückt (Jundt et al. 2002; Radtke et al. 2004; Jundt et al. 2008). Welche Funktion dem Verlust der B-Zell-Identität in der Pathogenese des HL zukommt, ist bislang unklar. Möglicherweise spielt dies eine Rolle beim Überleben der negativen Selektion im GC einer möglichen HRS-Vorläufer-Zelle mit destruktiven IgV-Gen-Mutationen.

1.4.4 Deregulierte Signalwege im HL

HRS-Zellen zeigen zahlreiche konstitutiv aktive Signalwege, die zu ihrem charakteristischen Phänotyp beitragen. Manche der Mechanismen dieser Aktivierung sind bekannt. So konnten Genmutationen, autokrine Stimulations-Schleifen und Stimulation durch Zellen des charakteristischen Mikromilieus für die konstitutiven Signalwege verantwortlich gemacht werden.

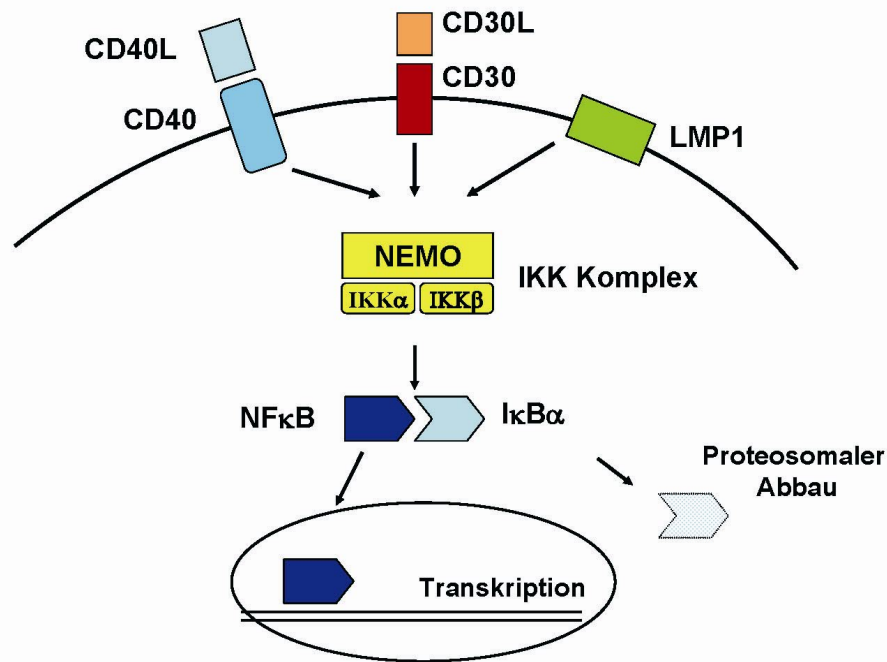


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Aktivierung und Regulation des NF-κB-Signalwegs in HRS-Zellen. Durch Stimulation der TNF-Rezeptoren CD40 und CD30 durch Liganden, auf Zellen des Mikromilieus oder endogene LMP1-Signalübermittlung (in EBV-positiven HRS-Zellen) kommt es zur Aktivierung des IKK-Komplexes. Die IKK phosphorylieren in der Folge den NF-κB-Inhibitor IκBα, der daraufhin proteasomal abgebaut wird und die NF-κB-Dimere in den Kern entlässt, wo dieser die Transkription zahlreicher Zielgene initiiert.

Konstitutive NF-κB-Aktivität spielt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese und dem Überleben von HRS-Zellen. Dieser Transkriptionsfaktorkomplex setzt sich in unterschiedlicher Komposition aus Homo- und Heterodimeren zusammen und besteht aus den Untereinheiten p50, p52, p65 (RelA), Rel und RelB (Hayden und Ghosh 2008). Im nicht-stimulierten Zustand befinden sich die NF-κB-Dimere inaktiv im Zytoplasma, entweder durch die Bindung an ihren Inhibitor IκBα oder in Form von nicht aktiven Vorläufern. Infolge von Stimulation durch BCR oder TNF-Rezeptor-Familienmitglieder, wie z.B. CD30 oder CD40, kommt es zur Aktivierung des IκB-Kinase-Komplexes (IKK), dessen katalytischen Untereinheiten die IκBα-Proteine an deren Serin-Resten der Positionen 32 und 36 phosphorylieren, was in der Folge zur

Ubiquitinierung und proteasomalen Degradation von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ führt. Die so befreiten NF- κB -Dimere wandern in den Kern, wo sie die Transkription zahlreicher Zielgene initiieren (Abbildung 1). Da auch die Ausprägung der eigenen Inhibitoren wie z.B. $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, A20, p50 aktiviert wird, ist diese Aktivität in der Regel zeitlich streng kontrolliert (Sen 2006). Zu weiteren Zielgenen des NF- κB -Komplexes gehören zahlreich pro-inflammatorische Zytokine wie z.B. IL6, IL13, $\text{TNF}\alpha$ und RANTES, sowie anti-apoptotische Faktoren wie BCLXL, BIRC3 und FLIP (Hinz et al. 2002). Vermutlich aufgrund der Kontrolle der Ausprägung dieser Gene sind HRS-Zellen in ihrem Überleben abhängig von konstitutioneller NF- κB -Aktivität (Bargou et al. 1997; Hinz et al. 2001; Izban et al. 2001). Auch L&H-Zellen des NLP HL zeigen Ausprägung zahlreicher Zielgene von NF- κB (Brune et al. 2008). Die molekularen Ursachen für die Aktivierung von NF- κB sind nur teilweise verstanden. Die Stimulation von TNF-Rezeptoren auf HRS-Zellen wie z.B. CD30, CD40 und RANTES durch Zellen des Mikromilieus, die die entsprechenden Liganden ausprägen, tragen vermutlich zu diesem Phänomen bei (Carbone et al. 1995a; Carbone et al. 1995b; Pinto et al. 1996; Fiumara et al. 2001). Bei EBV-positiven HL scheint daneben auch das virale Protein LMP1, das einen konstitutiven CD40-Rezeptor nachahmt, zu der Aktivierung des NF- κB -Signalweges beizutragen (Gires et al. 1997).

Die zentrale Bedeutung des konstitutiv aktiven NF- κB -Signalweges unterstreicht auch die Kooperation mit einer weiteren deregulierten Signal-Kaskade im HL. So wird in HRS-Zellen die Ausprägung von JUNB, einem Mitglied des AP-1-Transkriptionsfaktorkomplexes, durch NF- κB reguliert (Mathas et al. 2002). AP-1 fördert die Proliferation von HRS-Zellen und kontrolliert die Ausprägung von Genen wie z.B. CD30 und das immunsupprimierende Protein Galectin1 (Juszczynski et al. 2007).

HRS-Zellen rekrutieren vermutlich ihr Mikromilieu durch die Sekretion zahlreicher Zytokine und Chemokine. Zytokinstimulation wird intrazellulär über den JAK/STAT-Signalweg verarbeitet. STAT-Transkriptionsfaktoren liegen normalerweise inaktiv im Zytoplasma vor. Zytokinsignale führen zur Aktivierung der Januskinasen (JAK), welche wiederum die STAT-Proteine phosphorylieren, die daraufhin dimerisieren, in den Kern wandern und die Ausprägung ihrer Zielgene aktivieren (O'Shea und Murray 2008). Konstitutive Aktivierung von STAT-Proteinen, wie STAT3, STAT5 und STAT6 lässt sich in HRS-Zellen nachweisen (Kube et al. 2001; Hinz et al. 2002; Skinnider et al. 2002). Interessanterweise verlieren tonsilläre B-Zellen, in denen

STAT5 verstärkt ausgeprägt wird, ihren B-Zell-Phänotyp, prägen ferner Marker aus, wie sie auch in HRS-Zellen zu finden sind, und zeigen in geringem Anteil multinukleäre Zellen (Scheeren et al. 2008). STAT5-Ausprägung wird durch NF- κ B gesteuert, während die Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors vermutlich über auto- oder parakrine IL21-Rezeptor-Signale vermittelt wird (Hinz et al. 2002; Scheeren et al. 2008).

1.4.5 Genetische Läsionen in HRS-Zellen

HRS-Zellen zeigen ein hohes Maß an chromosomaler Instabilität, repräsentiert durch komplexe Karyotypen und zahlreiche numerische und strukturelle chromosomale Anomalien. Das Auftreten von chromosomaler Instabilität in Lymphomen ist selten und besser bekannt von soliden Tumoren (Weber-Matthiesen et al. 1995; Gasparini et al. 2007). Abgesehen von klonalen Aberrationen, die in jeder HRS-Zelle eines Tumors nachgewiesen werden können, treten auch diverse subklonale Veränderungen auf, was für eine generelle chromosomale Instabilität in diesen Zellen spricht. Der zugrunde liegende Mechanismus der genomischen Instabilität in HRS-Zellen ist nicht bekannt. Es finden sich in HRS-Zellen jedoch auch klonale, wiederkehrende chromosomale Aberrationen. So lassen sich in ca. 50% aller HL chromosomale Amplifikationen oder Zugewinne der chromosomalen Bande 2p16 identifizieren. Dieser Abschnitt des Genoms beherbergt das REL-Gen, welches für eine Unter-einheit des NF- κ B-Komplexes codiert (Joos et al. 2002; Martin-Subero et al. 2002). Hierbei scheinen die genomischen Amplifikationen mit dem gehäuften Auftreten nukleären Rel-Proteins zu korrelieren, was die pathogenetische Relevanz dieser Aberration erklären könnte (Barth et al. 2003). In 10-20% der HL könnten inaktivierende Mutationen in den Inhibitoren I κ B α und I κ B ε eine weitere Erklärung für die fehlregulierte NF- κ B-Aktivität sein (Cabannes et al. 1999; Emmerich et al. 1999; Jungnickel et al. 2000; Emmerich et al. 2003). Eine mechanistische Erklärung für den deregulierten JAK/STAT-Signalweg in HRS-Zellen könnten destruktive Mutationen des SOCS1-Gens darstellen, welche in cHL und NLP HL zu finden sind (Weniger et al. 2006; Mottok et al. 2007). Das SOCS1-Gen codiert für einen Inhibitor Zytokin-vermittelter Signale in der JAK/STAT-Signalkaskade. Chromosomale Amplifikationen des JAK2-Genlocus in etwa einem Viertel aller HL stellen eine weitere mögliche Erklärung für die konstitutive STAT-Aktivität in HRS-Zellen dar (Joos et al. 2000).

Wie zahlreiche B-Zell-Lymphome weisen auch HL Ig-assoziierte chromosomale Translokationen auf (Martin-Subero et al. 2006). BCL6-Translokationen wurden dabei in HRS-Zellen des cHL im Gegensatz zu L&H-Zellen des NLPHL selten gefunden (Wlodarska et al. 2003; Renne et al. 2005; Martin-Subero et al. 2006). Kandidatengene, wie MYC, CCDC1 oder BCL2, die in zahlreichen NHL in Ig-Translokationen involviert sind, ließen sich nicht identifizieren.

Obwohl HRS-Zellen den apoptose-induzierenden Rezeptor FAS ausprägen, sind sie resistent gegen CD95-Ligand-induzierte Apoptose (Metkar et al. 1999; Re et al. 2000). In etwa 10% der HL kann dieses Phänomen durch inaktivierende Mutationen im FAS-Gen erklärt werden (Müschen et al. 2001; Maggio et al. 2003), jedoch muss dieser Resistenz in den meisten der Fälle ein anderer Mechanismus zugrunde liegen.

TP53-Mutationen sind bei NHL weit verbreitet. In diesen Fällen lässt sich nach Aminosäuren-Austausch-Mutationen häufig starke Proteinexpression feststellen. Da dies auch in HRS-Zellen zu identifizieren ist, wurden einige Studien zu TP53-Mutationen in HRS-Zellen durchgeführt, die aber nur ein seltenes Auftreten solcher Mutationen zu Tage brachten (Montesinos-Rongen et al. 1999; Küpper et al. 2001; Maggio et al. 2001). Möglicherweise könnten chromosomale Amplifikationen des MDM2-Genlocus zu einer TP53-Inhibition führen (Küpper et al. 2001).

1.4.6 Zelluläre Interaktion von HRS-Zellen

Eine Besonderheit des HL ist die Tatsache, dass HRS-Zellen nur ca. 1% der Tumormasse repräsentieren. Die Mehrzahl des zellulären Infiltrats setzt sich aus Zellen verschiedener hämatopoetischer Linien zusammen. Es existieren diverse Hinweise, dass HRS-Zellen stark von den Interaktionen mit ihrer Mikroumgebung abhängig sind. So ist es bislang trotz zahlreicher Bemühungen nur in seltenen Fällen gelungen, Zelllinien von primären HRS-Zellen zu etablieren. Des Weiteren ist es nicht möglich, HRS-Zellen in immundefizienten Mäusen wachsen zu lassen (Drexler 1993; Kapp et al. 1993; Meggetto et al. 1996; Wolf et al. 1996). Einer der Gründe hierfür könnte die beschriebene Abhängigkeit der transkriptionellen Aktivität von NF- κ B sein. Die extrazellulären Signale, die dazu führen, wie z.B. CD30- oder CD40-Stimulation, liefern wahrscheinlich Zellen der Mikroumgebung (s.o.).

HRS-Zellen sind häufig von CD4⁺-T-Helferzellen umgeben. Diese T-Zell-Rosetten kommen wahrscheinlich durch von HRS-Zellen ausgeprägten Adhäsions-

molekülen wie CD58 (ICAM-1) und CD54 (LFA-3) zustande, deren Liganden von umliegenden T-Zellen ausgeprägt werden (Ellis et al. 1992; Delabie et al. 1995). HRS-Zellen sekretieren zudem große Mengen des Chemokins TARC, das normalerweise von dendritischen Zellen synthetisiert wird und CD4⁺-T-Zellen vom Th2-Typ anzieht. Dies könnte eine mechanistische Erklärung für die starke Einwanderung von T-Zellen des Th2-Typs sein (van den Berg et al. 1999).

IL-13 ist ein Zytokin, das von T-Zellen synthetisiert wird, und einen starken Einfluss auf Proliferation und Überleben von B-Zellen ausübt. IL13 wie auch der IL13-Rezeptor werden in HRS-Zellen in einem Großteil der cHL-Fälle ausgeprägt (Kapp et al. 1999; Skinnider et al. 2001). Der Rezeptor von IL-13 wird jedoch auch auf umliegenden Histiozyten und Lymphozyten ausgeprägt, so dass das von HRS-Zellen sekretierte IL-13 Einfluss auch auf die umgebenden Zellen nehmen könnte (Skinnider et al. 2001). Wie viele andere Zytokine ist auch IL13 ein NF- κ B-Zielgen, was die zentrale Bedeutung für diesen Transkriptionsfaktor für den charakteristischen Phänotyp der HRS-Zellen weiter unterstreicht.

1.4.7 Epstein-Barr-Virus (EBV)

EBV ist ein γ -Herpesvirus, mit dem mehr als 90% aller Menschen weltweit infiziert sind. Die primäre Infektion in der Kindheit verläuft normalerweise asymptomatisch. Nach Infektion verbleibt das Virus latent in Gedächtnis-B-Zellen mit einer Frequenz von ca. einer infizierten Zelle pro 10^5 – 10^6 Gesamt-B-Zellen (Kutok und Wang 2006). Bei einer verspäteten Infektion im jungen Erwachsenenalter kann es zur Ausbildung der infektiösen Mononukleose kommen. Menschen, die an einer infektiösen Mononukleose erkranken, haben ein signifikant höheres Risiko, später an einem cHL zu erkranken (Rosdahl et al. 1974). In ca. 40% aller cHL-Fälle sind die HRS-Zellen mit dem EBV infiziert (Kutok und Wang 2006). Die Tatsache, dass das Virusgenom in klonaler Form in den HRS-Zellen vorliegt, deutet daraufhin, dass eine Vorläufer-Zelle des HL-Klons bereits infiziert war, was als weiterer Hinweis auf eine pathogenetische Bedeutung gewertet werden kann (Anagnostopoulos et al. 1989).

Die Mehrzahl aller EBV-positiven HRS-Zellen prägen die viruscodierten Gene LMP1 und LMP2a aus. LMP1 ist in der Lage, Rattenfibroblasten zu transformieren; und Mäuse, die ein LMP1-Transgen ausprägen, entwickeln B-Zell-Lymphome (Wang et al. 1985; Kulwichit et al. 1998). Eine Erklärung hierfür scheint die angesprochene Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs zu sein (Gires et al. 1997). Außerdem aktiviert

LMP1 den AP-1- und den JAK/STAT-Signalweg (Gires et al. 1999; Kutz et al. 2008). Auf die Bedeutung des LMP2a-codierten Proteins im Zusammenhang mit der Mimikry des BCR in HRS-Zellen wurde bereits hingewiesen.

1.4.8 Etablierung von HL-Zelllinien

Im Gegensatz zu anderen Lymphomentitäten, wie z.B. DLBCL oder BL, existieren nur wenige HL-Zelllinien, da sich, wie oben erwähnt, aus primären HRS-Zellen nur sehr schwer Zelllinien etablieren lassen. Insgesamt wurden bislang nur 13 verlässliche HL-Zelllinien generiert (Drexler 1993; Wolf et al. 1996; Mader et al. 2007). Keine dieser Zelllinien stammt dabei aus der primären Lokalisation von HRS-Zellen, den Lymphknoten. Vielmehr wurden HL-Linien bislang nur aus Pleuralergüssen, peripherem Blut oder Knochenmark gewonnen. Alle diese Zelllinien stammen ferner von Patienten im fortgeschrittenen Stadium des HL, oft nach Chemo- und/oder Radiotherapie, was die Möglichkeit therapieinduzierter sekundärer Veränderungen wahrscheinlich macht. Sofern möglich, ist es aus diesen Gründen geboten, Untersuchungen an HL auch an primären Biopsaten durchzuführen.

In bisher nur einem Fall konnte die Herkunft einer HL-Zelllinie von den primären HRS-Zellen des Patienten auf molekularer Ebene nachgewiesen werden. Dies ist die HL-Zelllinie L1236 (Kanzler et al. 1996b). EBV-positive HL-Zelllinien sind unterrepräsentiert, während HL-Linien mit einem T-Zell-Ursprung im Vergleich zum Auftreten dieser in primären HL-Fällen überrepräsentiert erscheinen.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Trotz der Tatsache, dass das HL mit dem Bericht von Thomas Hodgkin im Jahr 1832 das zuerst beschriebene Lymphom war, sind die transformierenden Ereignisse, die an der Pathogenese des HL beteiligt sind, unbekannt. Dies trifft in weiten Teilen auch auf NHL zu. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, genetische Läsionen zu identifizieren und funktionell zu charakterisieren, die an der Transformation von HRS-Zellen beteiligt sind.

Seit Aufklärung der Abstammung von HRS-Zellen aus B-Zellen liegt die Vermutung nahe, dass Ig-assoziierte Translokationen an der Pathogenese des HL beteiligt sind. Zytogenetische Untersuchungen jüngerer Zeit bestätigen diese Annahme durch Demonstration von Bruchpunkten in den Ig-Loci. Derartige Translokationen sollten durch Anwendung sensitiver PCR-Methoden molekular charak-

terisiert werden und auf diesem Wege Gene identifiziert werden, die bei der Entstehung des HL eine Rolle spielen.

Untersuchungen von transformierenden Ereignissen in Form von Mutationsstudien in klonal verwandeten Kombinationslymphomen, die von einer gemeinsamen Vorläufer-Zelle abstammen, sollten dabei Einblicke in die Entstehung solcher Lymphome verschaffen und die Rolle der analysierten transformierenden Ereignisse in HL und NHL aufklären.

Darüber hinaus ergaben sich im Laufe der Arbeit weitere Fragestellungen zur Beteiligung von Genmutationen an pathogenetisch relevanten Eigenschaften von HL und NHL. So sollte untersucht werden, ob Genmutationen die Ursache für die FAS-vermittelte Apoptose-Resistenz sein könnten, die in HL-Zelllinien zu beobachten ist. Außerdem galt es, Hinweise aus Mausstudien auf Tumorsuppressorgene in humanen Lymphomen zu überprüfen,

Ein weiteres Ziel der Arbeit lag darin, Genmutationen zu identifizieren, die zur konstitutiven NF- κ B-Aktivität des HL und des ABC-DLBCL beitragen, und diese funktionell an Zelllinien der entsprechenden Lymphome zu überprüfen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Puffer, Enzyme

Für die vorliegende Arbeit wurden Chemikalien und Reagenzien in *pro analysi*-Qualität folgender Hersteller eingesetzt: *Amersham-Biosciences* (Freiburg), *Bio-Rad* (München), *Fluka* (Neu-Ulm), *Gibco-Lifetechnologies* (Eggenstein), *Merck* (Darmstadt), *Roth* (Darmstadt), *Serva* (Heidelberg) und *Sigma-Aldrich* (Steinheim). Die entsprechenden Lösungen und Puffer sind nach Standardprotokollen hergestellt worden (Shambrook et al., 1989). Außerdem wurden Enzyme von *Invitrogen* (Groningen, Niederlande), *New England Biolabs* (Frankfurt/M.), *Promega* (Mannheim), *Roche* (Mannheim), *Fermentas* (St. Leon Rot) sowie *Stratagene* (Heidelberg) nach Herstellerangaben verwendet.

2.1.2 Kits

An dieser Stelle sind nur die Kits aufgeführt, die nicht im nachfolgenden Methodenteil separat erwähnt werden und nach Herstellerangaben verwendet wurden :

- *5'/3' RACE Kit, 2nd Generation* (Roche)
- *Steady-Glo Luciferase Assay System* (Promega)
- *illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit* (GE Healthcare, München)

2.1.3 Plasmidvektoren

Plasmid	Beschreibung
pRTS	episomal vererbter Expressionsvektor NGFR und Luziferase (Bornkamm et al. 2005)
pRTS-A20	episomal vererbter Expressionsvektor NGFR und A20 (Bornkamm et al. 2005)
pRTS-I κ B α	episomal vererbter Expressionsvektor NGFR und I κ B α ^{S23,36A} (Bornkamm et al. 2005)
pGIPZ-Spel	lentiviraler Expressionsvektor für tGFP; (Derivat von pGIPZshRNA, Open Biosystems, Huntsville, AL, USA)
pGIPZ-Spel-I κ B α	lentiviraler Expressionsvektor für tGFP und I κ B α ^{S23,36A}
pGIPZ-Spel-Luc	lentiviraler Expressionsvektor für tGFP und Luziferase
pGIPZ-Spel-A20	lentiviraler Expressionsvektor für tGFP und A20
pGIPZ-NheI	lentiviraler Expressionsvektor für tGFP
pGIPZ-NheI-I κ B α	lentiviraler Expressionsvektor für I κ B α ^{S23,36A} und tGFP
pGIPZ-NheI-Luc	lentiviraler Expressionsvektor für Luziferase und tGFP
pGIPZ-NheI-A20	lentiviraler Expressionsvektor für A20 und tGFP
pMD2.G	Expressionsvektor für VSV-G 'envelope' Protein; (Addgene, Cambridge, MA, USA)
psPAX2	Expressionsvektor für lentivirale Verpackungsproteine; (Addgene)

2.1.4 Lentiviren

Virus	Beschreibung
pGIPZ-Spel	Lentivirus zur Expression von tGFP unter einem CMV-Promoter
pGIPZ-Spel-IκBα	Lentivirus zur Expression von tGFP und IκBα ^{S23,36A} unter einem CMV-Promoter mit Hilfe einer zwischen den Genen liegenden IRES-Sequenz
pGIPZ-Spel-Luc	Lentivirus zur Expression von tGFP und Luc unter einem CMV-Promoter mit Hilfe einer zwischen den Genen liegenden IRES-Sequenz
pGIPZ-Spel-A20	Lentivirus zur Expression von tGFP und A20 unter einem CMV-Promoter mit Hilfe einer zwischen den Genen liegenden IRES-Sequenz
pGIPZ-NheI	Lentivirus zur Expression von tGFP unter einem CMV-Promoter
pGIPZ-NheI-IκBα	Lentivirus zur Expression von IκBα ^{S23,36A} und tGFP unter einem CMV-Promoter mit Hilfe einer zwischen den Genen liegenden IRES-Sequenz
pGIPZ-NheI-Luc	Lentivirus zur Expression von Luc und tGFP unter einem CMV-Promoter mit Hilfe einer zwischen den Genen liegenden IRES-Sequenz
pGIPZ-NheI-A20	Lentivirus zur Expression von A20 und tGFP unter einem CMV-Promoter mit Hilfe einer zwischen den Genen liegenden IRES-Sequenz

2.1.5 Antikörper

Antigen	Bezeichnung	Erzeugt in	Verdünnung	Verwendung
CD30	BerH2	Maus	1:40	Immunhistochemie Gefriergewebe
β-Actin	1-19	Ziege	1:500	Immunoblot
IκBα	C-21	Maus	1:1000	Immunoblot
A20	59A426	Maus (erzeugt mit rek. Voll-Längen-A20-Protein)	1:500	Immunoblot
NGFR	ME20.4-1.H4	Maus	1:11	FACS (APC-Kanal)
Sekundärantikörper:				
Anti mausbiotinylierter βF1		Kaninchen	1:10	Immunhistochemie
Anti-Mouse Peroxidase AffiniPure F(ab') ₂ Fragment	115-036-062	Ziege	1:500	Immunoblot
Peroxidase AffiniPure F(ab') ₂ Fragment	305-036-003	Kaninchen	1:2000	Immunoblot

2.1.6 Oligonukleotide

LDI-PCR

Name	Sequenz 5' > 3'	Verwendung
JH Xba int for	ACCCTTGAAAGTAGCCCATGCCTTC	LDI-PCR Ig JH-Locus 1. Runde
JH Xba ex for	CCTTGCTAAGTCATTGACTGTAGGTC	LDI-PCR Ig JH-Locus 2. Runde
JH Pae int for	AGAGAACTGTCGGAGTGGGTGAATC	LDI-PCR Ig JH-Locus 1. Runde
JH Pae ex for	CTTTAGAATTATGAGGTGCGCTGTGTG	LDI-PCR Ig JH-Locus 2. Runde
JH Mun int for	GCTGGAAGCAGATGATGAATTAGAGTC	LDI-PCR Ig JH-Locus 1. Runde
JH Mun ex for	GCTCAGCTAAGAAATACTAGCACAGTG	LDI-PCR Ig JH-Locus 2. Runde
JH Hind int for	GCCCTTGTTAATGGACTTGGAGGA	LDI-PCR Ig JH-Locus 1. Runde
JH Hind ex for	TGGGATGCGTGGCTTCTGCT	LDI-PCR Ig JH-Locus 2. Runde
JH BglIII int for	CTTCTGGTTGTGAAGAGGTGGTTTTG	LDI-PCR Ig JH-Locus 1. Runde
JH BblIII ex for	GAAGCAGGTCACCGCGAGAGT	LDI-PCR Ig JH-Locus 2. Runde
J6 II int rev	TAGCAGAAAACAAAGGCCCTAGAGTG	LDI-PCR Ig JH-Locus 1. Runde
J6 II ex rev	TGCAATGCTCAGGAAACCCACAGG	LDI-PCR Ig JH-Locus 2. Runde
upsmu II int for	AATGAGATGGCTTTAGCTGAGACAAGC	LDI-PCR Switchµ-Bereich 1. Runde
upsmu II ex for	TCCATCCAGCTTTCAGAAATGGACTC	LDI-PCR Switchµ-Bereich 2. Runde
upsmu Hind III int rev	TCCTGTCTTCAGCACTATCTGATTGAG	LDI-PCR Switchµ-Bereich 1. Runde
upsmu Hind III ex rev	CCTAAAGTGAGTAGTTGAAAAGTGGTC	LDI-PCR Switchµ-Bereich 2. Runde
upsmu Pae I int rev	CTCAATTCCAGACACATATCACTCATGG	LDI-PCR Switchµ-Bereich 1. Runde
upsmu Pae I ex rev	CTCAGAAGCCACTTCAAACATATCCTG	LDI-PCR Switchµ-Bereich 2. Runde
upsmu Mbo int rev	GGTCAGCCTCGCCTTATTTTAGAAACG	LDI-PCR Switchµ-Bereich 1. Runde
upsmu Mbo ex rev	TCCAGGTGTTGTTTTGCTCAGTAGAG	LDI-PCR Switchµ-Bereich 2. Runde

DISC-Gene

Name	Sequenz 5' > 3'	Sequenz 5' > 3'	Exon
CASP8 E11	TGTTTGTTCATCTCTAGTGTTC	GGCCCTTTTGGTATAGCTTTTGT	11 (1. Runde)
CASP8 E11 (intern)	ACATCTCTAGTGTTCGACCCACA	CTTTTGGTATAGCTTTTGTCTCTC	11 (2. Runde)
CASP8 E12	CTGTGGTCTGTGAATTACTGTG	TGACCTGTTAATGTGATCTAAATC	12 (1. Runde)
CASP8 E12 (intern)		ATGGAGTAGGGGGGGAAGGTA	12 (2. Runde)
CASP8 E13	TTCATCAGTTGCGTTCCTCCAC	GAGGCGGAGCTTGCGGTGAG	13 (1. Runde)
CASP8 E13 (intern)	CTGGGCGACAGAGCGAGATTTC		13 (2. Runde)
CASP10 E9	CCGGCCTTGTTCAGTTCTTCA	TACCAAAGGTGTTGAATGAGAGTA	9 (1. Runde)
CASP10 E1 E9 (intern)		GAACAACGTAGAACTCTCACCC	9 (2. Runde)
FADD E1	TGAATCAGGCACCGGAGTGCAG	GGGCTGTACGGAGAAAACCCAC	1 (1. Runde)
FADD E1 (intern)	GCCAGCGAGCCGAGGACAGAG		1 (2. Runde)
FADD E2	ACTTGCGCTCTGTGCTGAAAAG	TGACCTGTTAATGTGATCTAAATC	2 (1. Runde)
FADD E2 (intern)		CTGTGTAGATGCCTGTGGTCCA	2 (2. Runde)

TNFAIP3

Name	Sequenz 5' > 3'	Verwendung
A20E2exF	TGCCTACAGATCAGGGTAATGACAAG	Exon 2 (1. Runde)
A20E2intF	GTTTCCTGCAGGCAGCTATAGAGG	Exon 2 (2. Runde)
A20E2R	AGCTTCATGAATGGGGATCCAGCAG	Exon 2 (1. und 2. Runde)
A20E2seqF	CCTTTTCAGGTGTTGGAGAG	Sequenzierung Exon 2
A20E3exF	ACCATTTCAGTCCCCTAGAATAGCAG	Exon 3 (1. Runde)
A20E3intF	ACCTTTGCTGGGTCTTACATGCAG	Exon 3 (2. Runde)
A20E3R	TATGCCACCATGGAGCTCTGTTAG	Exon 3 (1. und 2. Runde)
A20E3seqF	TCCTTTCTGTCCTCAGGTG	Sequenzierung Exon 3
A20E4-5exF	TGAATAATTGTAGAGTGATGTCAGAATGAC	Exon 4/5 (1. Runde)
A20E4-5intF	TACAGGGAGTACAGGATACATTCAAGC	Exon 4/5 (2. Runde)
A20E4-5R	GGAAAACCCCTGATGTTTCAGTGTCTAG	Exon 4/5 (1. und 2. Runde)
A20E6exR	AATCACTCTACTGTTGAGCTTCAGG	Exon 6 (1. Runde)
A20E6F	TGAGATCTACTTACCTATGGCCTTG	Exon 6 (1. und 2. Runde)
A20E6intR	TCAGGTGGCTGAGGTTAAAGACAG	Exon 6 (2. Runde)
A20E7.1exF	GGTTCTACAATTCTTGCCATAATCCAC	Exon 7 (1. Runde)
A20E7.1intF	GAGCTAATGATGTAAATCTTGTTGTG	Exon 7 (2. Runde)
A20E7.1R	CAAAATCCGTTGTGCTGCACATTCAG	Exon 7 (1. und 2. Runde)
A20E7.2exR	CAGTTCTGCCTGACTGCCTACATG	Exon 7 (1. Runde)
A20E7.2Fa	CTCTCGGGGAGAAGCCTATGAGC	Exon 7 (1. und 2. Runde)
A20E7.2intR	GAACAAAACCCCTTCTGGACAGCAG	Exon 7 (2. Runde)
A20E8exR	ATGAGGAGACAGAACCTGGCAGAG	Exon 8 (1. Runde)
A20E8F	ACTGTCAGCATCTCTGTATCGGTG	Exon 8 (1. und 2. Runde)
A20E8intR	TGTCAGTGTGCGGTAGAAAACGCTC	Exon 8 (2. Runde)
A20E9exF	GTAGACTCCACACTCTCCAATGAG	Exon 9 (1. Runde)
A20E9intF	GTGCTCTCCCTAAGAAATGTGAGC	Exon 9 (2. Runde)
A20E9R	GGGTTACCAAACCTGAGCATCGTGC	Exon 9 (1. und 2. Runde)
A20P1for	GACTTGGGACTTTGCGAAAGGATCG	Produkt 1 von cDNA
A20P1rev	TTTCAAAGGGGCGAAATTGGAACCTG	Produkt 1 von cDNA
A20P2for	TTGTCTTTGCAACATCCTCAGAAGG	Produkt 2 von cDNA
A20P2rev	ACGCCAAGGGCTCATAGGCTTCTC	Produkt 2 von cDNA
A20P3for	ACAAACTCCCAAAGCTGAACCTCAAG	Produkt 3 von cDNA
A20P3rev	GAATGGTGTTCTGGAACCTGGAC	Produkt 3 von cDNA
A20P4for	CACACTGTGTTTCATCGAGTACAGAG	Produkt 4 von cDNA
A20P4rev	TAGCACCATGATGACTGACAGCTCG	Produkt 4 von cDNA

BAD

Name	Sequenz 5' > 3'	Produkt von
BAD E1	Forward 5' – TTCCC GTT GCCCAAGCAACTAGG – 3' Reverse 5' – CTGTGGATGCAACTGGGATGCAG – 3'	Exon 1
BAD E1 Seq	Forward 5' – CAGCTGTGCCTTGACTACGTAACATC – 3' Reverse 5' – GATGTTACGTAGTCAAGGCACAGCTG – 3'	Sequenzierung Exon 1
BAD E2	Forward 5' – AGAGCTGATGGGGAGGGTTCAG – 3' Reverse 5' – CTGGTACTTCAGGTCCTGGCAC – 3'	Exon 2
BAD E3	Forward 5' – GAAGGCTCACGGAAGTGGAGAG – 3' Reverse 5' – TGTCGCTGGATGTCAGGCAGAG – 3'	Exon 3
BAD E3 Seq	Forward 5' – GTGAAGCCACGGAAGGCTTGGTCC – 3' Reverse 5' – GGACCAAGCCTTCCGTGGCTTCAC – 3'	Sequenzierung Exon 3

FAS

Name	Sequenz 5' > 3'	Exon
E7	CTTCTTATATTCTCTTAGTGTG	Exon 7 (1. Runde)
E7 Fi	TATGTTCTCACATGCATTCTAC	Exon 7 (2. Runde)
E7 R	CTCCATCTCAAACAAAATGAAAC	Exon 7 (1. Runde)
E7 Ri	AAGTAACAAAAAGCCAAATCAC	Exon 7 (2. Runde)
E8 F	TTAAGGAAAAATTAGAAGTTTACA	Exon 8 (1. Runde)
E8 Fi	TTTATTTGTCTTTCTCTGCTTC	Exon 8 (2. Runde)
E8 R	GTAGAATGTATGAGAAATAACAAG	Exon 8 (1. Runde)
E8 Ri	CCATAATATGTCACTGAAATTAG	Exon 8 (2. Runde)
E9 F	CACTAATGGGAATTTTCATTTAGA	Exon 9 (1. Runde)
E9 Fi	TGGGAATTTTCATTTAGAAAAACA	Exon 9 (2. Runde)
E9 R	TAATTGCATATACTCAGAACTGA	Exon 9 (1. Runde)
E9 Ri	TACTCAGAACTGAATTTGTTGT	Exon 9 (2. Runde)

Bruchpunkt-Klonierung L-1236

Name	Sequenz 5' > 3'	Verwendung
C10a1bfor	AATTCTAGGCCTAAGGGAAAAGCAGGG	Translokationsbruchpunkt PCR t(10;14) Igα2
C10a2bfor	TGGTGCGATCTCGGCTCACTATAGC	Translokationsbruchpunkt PCR t(10;14) Igα2
C10a3bfor	GGGAGATGTCCACAAAGGTTAGCTC	Translokationsbruchpunkt PCR t(10;14) Igα2
C10a4b2for	CAAACCTCTGACCTCAGGTGATCCAC	Translokationsbruchpunkt PCR t(10;14) Igα2
C10a4bfor	CAATTCTCCTACCTCAGCCTCCTGAG	Translokationsbruchpunkt PCR t(10;14) Igα2
C10a5bfor	GAGACAGAGTCTCACTCTGTTGCC	Translokationsbruchpunkt PCR t(10;14) Igα2
C10a6bfor	GAGATGGAGTCTCGCTATGTCTCTC	Translokationsbruchpunkt PCR t(10;14) Igα2
C10a7bfor	CCTCAAATCAGACCTGCAGGTATGG	Translokationsbruchpunkt PCR t(10;14) Igα2
C10m#1_1arev	TTTTAGGATCGGTCTAATCAGATCCTC	Translokationsbruchpunkt PCR t(10;14) Igμ
C10m#1_2arev	AACTGTTTCATTACAAGGGGCATTTGG	Translokationsbruchpunkt PCR t(10;14) Igμ
C10m#1_3arev	ACCCAGTGGGCTAAGATTGGACAG	Translokationsbruchpunkt PCR t(10;14) Igμ
C10m#1_4arev	ACCTTTGCTGTGGACTAAACAGGAAC	Translokationsbruchpunkt PCR t(10;14) Igμ
C10m#1_5arev	GCATTATGAAACGCCCATGGTCTCTG	Translokationsbruchpunkt PCR t(10;14) Igμ
C10m#1_6a2rev	AATCAGGCAGATAGCAGAAGACACAG	Translokationsbruchpunkt PCR t(10;14) Igμ
C10m#1_6arev	GGATTACAGGTGTGAGCCACCACTC	Translokationsbruchpunkt PCR t(10;14) Igμ
C10m#1_7a2rev	CATCTCACTCACTGCAACTTCTGCCTC	Translokationsbruchpunkt PCR t(10;14) Igμ
C10m#1_8arev	GATGGAGTCTCGCTATGTCTCTCAG	Translokationsbruchpunkt PCR t(10;14) Igμ
C10m#1_9arev	TCCTCAAATCAGACCTGCAGGTATGG	Translokationsbruchpunkt PCR t(10;14) Igμ

GDF10 / GDF2

Name	Sequenz 5' > 3'	Exon
GDF10_E1F	CGCAGTGGGCTACAACTTTTC	Exon 1
GDF10_E1R	CTGCCGGCTGTACTTCTCATAG	Exon 1
GDF10_E2F	TTACGGCCACTTTCCACTTCTAC	Exon 2
GDF10_E2R	GACCTATGTCTACCTATTTCCTGCC	Exon 2
GDF10_E3F	AGTATGGCCTGGGACTGTGAG	Exon 3
GDF10_E3R	GAGAAGGCAGCTCTGCTGGG	Exon 3
GDF2_E1F	GAGAAGGCAGCTCTGCTGGG	Exon 1
GDF2_E1R	GTGGACCTGTGAGTCCCACC	Exon 1
GDF2_E2F	CAGACCAAATTTGTTATCCCAGATG	Exon 2
GDF2_E2R	AGATTGAATCAGTCCTTGTGTGC	Exon 2

IkB α - genomisch

Name	Sequenz 5' > 3'	Exon
IkB 1b	TGGTCTGACTGGCTTGAAATTC	Exon 1 (1. und 2. Runde)
IkB 1c	CATCGCTGGTCCCCCGGCTC	Exon 1 (1. Runde)
IkB 1r	GCGTCCCCGCCCTCCCGACGA	Exon 1 (2. Runde)
IkB 2a	CGAAGTCCCCGGTTGCATAAGG	Exon 2 (1. Runde)
IkB 2b	AGTACAGGTCGTTCCGAGCTGG	Exon 2 (2. Runde)
IkB 2c	GGATCTGGGGTGACTCTGCTAC	Exon 2 (1. und 2. Runde)
IkB 3a	CCTGTCTAGGAGGAGCAGCAC	Exon 3 (1. Runde)
IkB 3b	AACCAGGAGACACGGGTTGAGG	Exon 3 (2. Runde)
IkB 3d	TAGGAGTTTAAGCTCTTGCCCTGGA	Exon 3 (1. und 2. Runde)
IkB 4b	AAAGAATAGGTGAAAGGAGTGAGG	Exon 4 (1. Runde)
IkB 4b2	GAGGGTTGAAACAGGTGGTTAT	Exon 4 (2. Runde)
IkB 4c	ATAAGCACGAGGAGCCTGACTCA	Exon 4 (1. und 2. Runde)
IkB 5a	AGCAGAAATTCCAAATGCAGCCAT	Exon 5 (1. und 2. Runde)
IkB 5c	GGAGGGTGAAGGGAATGGCAC	Exon 5 (2. Runde)
IkB 5d	GGAGCAGCTCTAGGGGCCTG	Exon 5 (1. Runde)
IkB 6a	GAGTTATTTCCAGTAGTGGCCTC	Exon 6 (1. Runde)
IkB 6b	CCCATCCCGGTAGCTTGGCAG	Exon 6 (2. Runde)
IkB 6d	GGGGTCAGTCACTCGAAGCAC	Exon 6 (1. und 2. Runde)

IkB α - RNA

Name	Sequenz 5' > 3'	Verwendung
IkB5'UTR	CGCGGCGGCGCTGCAGAG	Expressionsanalyse NFKBIA Varianten
IkBE2for1st	GGATCACTTCCATGGTCAGTG	Expressionsanalyse NFKBIA Varianten
IkBE2for2nd	TTCTTCATGGATGATGGCCAAG	Expressionsanalyse NFKBIA Varianten
IkBE2rev	CAACTTCCAGAACAACCTGCAG	Expressionsanalyse NFKBIA Varianten
IkBE4for	GATAGAGGCTAAGTGTAGACAC	Expressionsanalyse NFKBIA Varianten
IkB c DNA	TCGTCCGCGCCATGTTCCAG	cDNA-Synthese Oligonukotide

L1236 RACE

Name	Sequenz 5' > 3'	Verwendung
cDNA_Syn	GCTTCTGAACCTAAGAGCAGGTG	cDNA-Synthese 3' RACE L-1236
Mu_1 st	GTGGGAAGTTTCTGGCGGTCAC	3' RACE L-1236
Mu_2 nd	TTTCGCTCCAGGTCACACTGAG	3' RACE L-1236
CH1_exon_1st	AGAGATGGCCTGAGCTGGTCAG	cDNA-Synthese 5' RACE L-1236
CH1_exon_2nd	CCTGTCCACCACCACTCCTC	5' RACE L-1236
CH1_exon_3rd	GTCCACTCTGGTGTGAGTGAAG	5' RACE L-1236

pRTS

Name	Sequenz 5' > 3'	Verwendung
Antisenserev	GGCCTCACTGGCCTTAGCCATACATCTGCTTGAAGTAAAGCATTG	Mutagenese C956IRAKp961B0248
Sensefor	GGCCTCACTGGCCACCATGGCTGAACAAGTCCTTCCTCAGGCTTTG	Mutagenese C956IRAKp961B0248
TNFAIP3-Sfil-F	GGCCTCACTGGCCACCATGGCTGAACAAGTCCTTCCTC	TNFAIP3 Insertion pRTS
TNFAIP3-Sfil-R	CAGTTCAAGCAGATGTATGGCTAAGGCCAGTGAGGCC	TNFAIP3 Insertion pRTS

pGIPz

Name	Sequenz 5' > 3'	Verwendung
3'LTRseqF	CACAAGTAGCAATACAGCAGCTACC	Sequenzierung pGIPZ
pGIPZ_3299_F	CGTTTAGTGAACCGTCAGATC	Sequenzierung pGIPZ
pGIPZ_3'LTR_F	TGTTGCCACCTGGATTCTG	Sequenzierung pGIPZ
pGIPZ_CMV_F	AACGGCACTGGTCAACTTG	Sequenzierung pGIPZ
pGIPZ_CMV_R	AATACGACTCACTATAGGAGG	Sequenzierung pGIPZ
pGIPZ_CTS_F	TTCTTTCCCTGCACTGTAC	Sequenzierung pGIPZ
pGIPZ_PSI_F	TAATACTGACGCTCTCGCAC	Sequenzierung pGIPZ
pGIPZ_RRE_R	GACTGTGAGTTGCAACAGATG	Sequenzierung pGIPZ
pGIPZ-4473F	CACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGG	Sequenzierung pGIPZ
pGIPZ-IRESR	GAAAGCCATACGGGAAGCAATAGC	Sequenzierung pGIPZ
Insert-SpeIF	ACCCGGACTAGTTCTAGTCAGCAAGCTTTTCGGCC	Inserierung CDS pGIPZ-Spe
Insert-SpeIR	CAGCTCACTAGTCTCAGTCGACAGCAGTACGCATG	Inserierung CDS pGIPZ-Spe
tGFP-SpeIF	TAGAAGACTAGTACTCTACTAGAGGATCTGCCACC	Austausch tGFP
tGFP-SpeIR	GGGAGAACTAGTGAATTTGCGGCCGCTACTTGTAC	Austausch tGFP
3'linkXbal-BsrGI	GTACAACCGGTGCTAGCCTCGAGC	Linker pGIPZ-NheI
5'linkXbal-BsrGI	CATGGCTCGAGGCTAGCACCGGTT	Linker pGIPZ-NheI
pGIPZ-SpeI-F	ATTACCACTAGTGCCTCTGGAACAATCAACCTCTGGATTAC	Erzeugung pGIPZ-SpeI
pGIPZ-SpeI-R	CTCGGTACTAGTGGTATTATCGTGTTTTTCAAAGGAAAACCAC	Erzeugung pGIPZ-SpeI

TP53

Name	Sequenz 5' > 3'	Exon
p53 4 D	AGGGTGAAGAGGAATCCCAAAGTT	Exon 4 (1. und 2. Runde)
p53 4 UA	ACTGAAGACCCAGGTCCAGATGAA	Exon 4 (1. Runde)
p53 4 UB	TTCTGTCCCTTCCCAGAAAACCTA	Exon 4 (2. Runde)
p53 5/6 D	AGGGCCACTGACAACCACCCCTTA	Exon 5 und 6 (1. und 2. Runde)
p53 5/6 UA	TGTTCACTTGTGCCCTGACTTTCA	Exon 5 und 6 (1. Runde)
p53 5/6 UB	CTCTGTCTCCTTCCTCTTCCTACA	Exon 5 und 6 (2. Runde)
p53 7/8 D	ACCGCTTCTTGTCTGCTTGCTTA	Exon 7 und 8 (1. und 2. Runde)
p53 7/8 UA	CAAGGCGCACTGGCCTCATCTT	Exon 7 und 8 (1. Runde)
p53 7/8 UB	CCTCATCTTGGGCCTGTGTTATCT	Exon 7 und (2. Runde)

CIITA

Name	Sequenz 5' > 3'	Verwendung
rs4774_E11F	CTGCAGGATCTGCTCTTCTCC	CIITA-SNP-Untersuchung rs4774 (1. Runde)
rs4774_E11Fint	TCAGCCACATCTTGAAGAGAC	CIITA-SNP-Untersuchung rs4774 (2. Runde)
rs4774_E11R	CTCTCAAAGTAGCGCATCACG	CIITA-SNP-Untersuchung rs4774 (1. und 2. Runde)
rs2228238_E12F	TGCCTTGAGCGACACGGTG	CIITA-SNP-Untersuchung rs2228238 (1. und 2. Runde)
rs2228238_E12R	CTGCACAAGCTTTCCAGGTC	CIITA-SNP-Untersuchung rs2228238 (1. Runde)
rs2228238_E12Rint	GCTTTGAAAGGCTCGATGGTG	CIITA-SNP-Untersuchung rs2228238 (2. Runde)
rs2229320_E11F	CCGCAGTACCTAGCATTGACC	CIITA-SNP-Untersuchung rs2228238 (1. Runde)
rs2229320_E11Fint	AAGAGGCCCTATGACAACTGG	CIITA-SNP-Untersuchung rs2228238 (2. Runde)
rs2229320_E11R	AGGTCCAGGGAGAAGTCTTGG	CIITA-SNP-Untersuchung rs2228238 (1. und 2. Runde)

CIITA

Name	Sequenz 5' > 3'	Verwendung
C2Ta in1	GGAGTCAGCCTTGAGGTGTA	CIITA-Bruchpunktklonierung (telomerisch vom Bruchpunkt)
C2Ta rev	CCCCTTTAACCATCCAACAA	CIITA-Bruchpunktklonierung (zentromerisch vom Bruchpunkt)
G1st	TCCACCTTGGTGTGCTGGGCTTGTG	CIITA-Bruchpunktklonierung C-gamma
5-Sg1	AGGGACTCAGAGACAGAG AAAAGAGC	CIITA-Bruchpunktklonierung S-gamma

2.2 Methoden**2.2.1 DNA-Arbeitsstechniken****2.2.1.1 DNA Präparation**

Die DNA-Gewinnung aus Geweben und Zellmengen zwischen $250-1 \times 10^6$ Zellen wurde nach dem Prinzip der Protein-Aussalzung und Alkohol-Fällung mit dem *Genra Pure Gene Kit* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.1.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur photometrischen DNA-Konzentrationsbestimmung wurde die Extinktion einer DNA-Lösung bei 260 und 280 nm gemessen. Folgende Formel liegt der DNA-Konzentrationsbestimmung zugrunde:

$$\text{Konzentration} = 62,9 \times \text{OD}^{260} - 36,0 \times \text{OD}^{280} \text{ } [\mu\text{g/ml}]$$

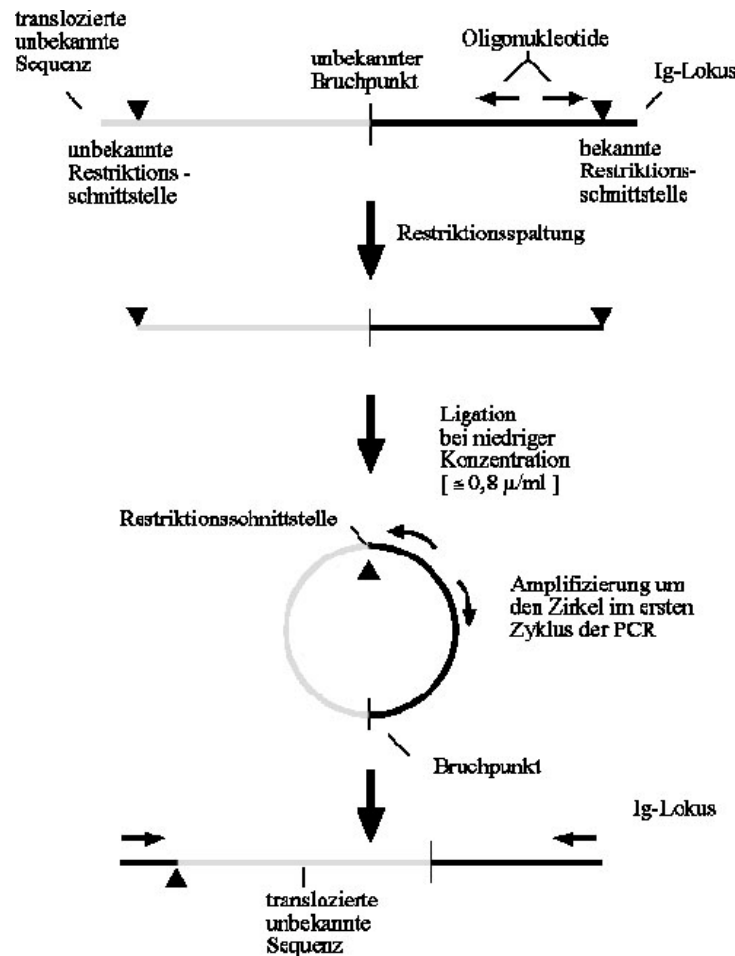


Abbildung 2: Prinzip der Langstrecken-Inversen-(LDI)-PCR

2.2.1.3 LDI-PCR zur Analyse von IgH-assoziierten Translokationen

Diese elegante Methode eignet sich dazu, mit relativ geringem Aufwand IgH-assoziierte Translokationen mit Beteiligung eines unbekannten Translokationspartners molekular zu charakterisieren. Mit ihrer Hilfe ist es in der Vergangenheit gelungen, die Gene BCL9, BCL10 und BCL11a zu identifizieren, die in Ig-assoziierten Translokationen in NHL involviert sind (Willis et al. 1998; Willis et al. 1999; Satterwhite et al. 2001). Die LDI-PCR basiert auf der restriktions-endonukleatischen Spaltung des genomischen DNA-Fragments, welches den Translokationsbruchpunkt enthält, und darauf folgender Zirkularisierung des ausgeschnittenen Fragments mittels DNA-Ligation bei niedriger Konzentration. Mit Hilfe eines Starter-oligonukleotidpaares, welches in entgegengesetzter Richtung verlängert wird, entsteht daraus ein PCR-Produkt, das die unbekannte translozierte Sequenz enthält, die auf beiden Seiten von Sequenzen des IgH-Locusses flankiert wird.

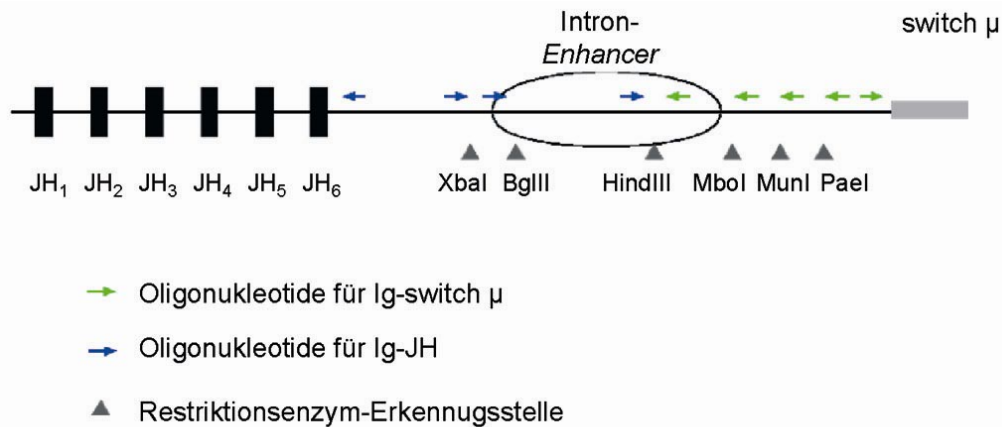


Abbildung 3: Schematische Darstellung der untersuchten Regionen der Ig-JH- und Ig-Switch-μ-LDI-PCR. Dargestellt ist der IgH-Locus in der Keimbahn-Konfiguration. Die Erkennungsstellen der dargestellten Restriktionsenzyme finden sich in dieser Konfiguration einmalig in diesem Genlocus. Im Falle einer Verbindung einer unbekannten Sequenz an ein JH-Gensegment oder die Switch-μ-Region entsteht eine zweite Restriktions-Erkennungsstelle. Dies kann auch in Folge einer (V)DJ-Umlagerung bzw. eines Klassenwechsels geschehen. Das nach Spaltung entstehende Fragment wird im zweiten Schritt der LDI-PCR zirkularisiert und dieses Molekül mit den dargestellten, auf dem Ig-Locus invers orientierten Oligonukleotiden vermehrt.

Die LDI-PCR wurde mit DNA-Mengen zwischen 1 ng-15 ng durchgeführt. Für die JH-LDI-PCR-Ansätze wurden die Restriktionsenzyme XbaI, BglII oder HindIII verwendet. Für die μ -LDI-PCR-Ansätze waren dies die Enzyme HindIII, MboI, MunI oder PaeI. Diese Restriktionsspaltungen wurden mit 2 U Enzym in einem Reaktionsansatz von 10 μ l für 2 h bei 37°C durchgeführt, gefolgt von 20 min bei 68°C. Nach Zugabe von 1 U (Weiss) T4-DNA-Ligase und entsprechendem Puffer wurde dieses Reaktionsgemisch 12 h bei 4°C inkubiert. Nach Isopropanol-Fällung bei Addition von 10 ng/ml Glykogen (Roche) wurde der getrocknete Niederschlag in 10 μ l Tris pH 8,5 gelöst und in die erste Runde der PCR eingesetzt. Nach Vollendung dieser Reaktion wurden 2 μ l von dieser Reaktion in eine zweite Runde eingesetzt und im Anschluss das Ergebnis mittels Agarose-Gelelektrophorese ausgewertet; die entstandenen Produkte wurden isoliert und sequenziert.

2.2.1.4 PCR-Bedingungen

PCR	Mg ²⁺ -Konzentration	Anlagerungs-temperatur	Verwendetes Polymerase-System
LDI-PCR (1. und 2. Runde)	0,75	66°C	GeneRuler XL (Applied Biosystems)
CIITA	0,75	64°C	GeneRuler XL (Applied Biosystems)
Bruchpunkt-Klonierung	3	63°C	Expand High Fidelity Kit (Roche)
Allelspezifische Ausprägung			
Fall1 Kombinationslymphom (RT-PCR)			
I κ B α -PCR			
1. Runde:			
Exons 1-2	2,5	65°C	Expand High Fidelity Kit (Roche) + 1M Betain
Exons 3-6	2	63°C	
2. Runde:			
individuelle Exons	2	65°C	Expand High Fidelity Kit (Roche)

FAS			
1. Runde	2	55°C	<i>Expand High Fidelity Kit (Roche)</i>
2. Runde	2	55°C	<i>Standard</i>
BAD	2,5	63°C	<i>Expand High Fidelity Kit (Roche) + 1M Betain</i>
CASP8			
CASP10			
FADD			
1. Runde:			
<i>Mastermix 1:</i>			
CASP8 Exons 11+12	1,5	63°C	<i>Expand High Fidelity Kit (Roche) + 1M Betain</i>
FADD Exon 2			
<i>Mastermix 2:</i>			
CASP8 Exon 13	1,5	63°C	<i>Expand High Fidelity Kit (Roche) + 1M Betain</i>
FADD Exon 1			
<i>Mastermix 3:</i>			
CASP10 Exon 9	1,5	63°C	<i>Expand High Fidelity Kit (Roche) + 1M Betain</i>
2. Runde:			
Individuelle Exons	1,5	63°C	<i>Standard</i>
A20 genomische DNA			
1. Runde:			
<i>Mastermix 1:</i>			
Exons 3, 6, 7-., 8	3	64°C	<i>Expand High Fidelity Kit (Roche)</i>
<i>Mastermix 2:</i>			
Exons 2, 4-5, 7.2, 9	3	64°C	<i>Expand High Fidelity Kit (Roche)</i>
2. Runde:			
Individuelle Exons	3	62°C	<i>Standard</i>
A20 RT-PCR	2	62°C	<i>Standard</i>
TP53			
1. Runde	2	61°C	<i>Expand High Fidelity Kit (Roche)</i>
2. Runde	2	61°C	<i>Standard</i>

Bei PCR aus mikrodisektierten Zellen wurden diese zuvor mit 0,25 mg/ml Proteinase K (*Roche*) für 2 h bei 50°C inkubiert, gefolgt von 5 min bei 95°C.

2.2.1.5 Elektrophoretische Trennung von DNA

Nukleinsäuren wurden mit Gelladepuffer versetzt und je nach Größe des aufzutrennenden DNA-Fragments in 0,8-2%igen (w/v) horizontalen Agarosegelen nach ihrer Größe getrennt. Diese 1 x TAE-Puffer-Gele mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid wurden bei 10-15 V/cm in 1 x TAE als Laufpuffer gefahren. Der Nachweis der Fragmente erfolgte durch UV-Licht-Anregung.

50 x TAE Puffer:	2 M Tris-Acetat 50 mM EDTA, pH 8,0 ad 1 lddH ₂ O
10x Gelladepuffer:	50% (v/v) Glycerin 0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylencyanol FF

2.2.1.6 Elution von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden mit dem *QIAEx-Gel Extraction Kit* oder *MiniElute Gel Extraction Kit* (*Qiagen*) nach Herstellerangaben aus Agarosegelen eluiert.

2.2.1.7 Reinigung von PCR-Produkten aus Reaktionsansätzen mittels Silica-Zentrifugen-Säulen

DNA-Fragmente wurden von Nukleotiden, Oligionukleotiden und Puffern befreit mittels des *E.Z.N.A.® Cycle-Pure Kits* (*PEQLAB*, Erlangen) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.1.8 Sequenzreaktion und Auswertung

Zur Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden wurde die entsprechende Menge der zu sequenzierenden DNA (siehe Herstellerangaben) mit 3 pmol des entsprechenden Oligonukleotids, 0,5 µl *Big Dye*-Lösung (*Applied Biosystems*) und 3,75 µl 5x *Sequencing Puffer* (*Applied Biosystems*) gemischt, mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt und die Sequenzreaktion nach Herstellerangaben durchgeführt. Durch die achtfache Reduktion der zu verwendenden *Big Dye*-Menge im Vergleich zu den Herstellerangaben konnten die zahlreich durchgeführten Sequenzierungen kostensparend durchgeführt werden. Nach Ethanol-Fällung wurden die Sequenzen auf einem ABI-3130-Sequenzierautomaten (*Applied Biosystems*) analysiert.

Die Auswertung der Sequenzierungen wurde durch Begutachtung der Sequenz-Elektropherogramme und Datenbankabgleich der Genom-Datenbank an der Universität von Kalifornien, Santa Cruz (*UCSC*: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>) durchgeführt.

Im Falle der TNFAIP3-Sequenzierungen wurden die Sequenzen neben der manuellen Begutachtung der Elektropherogramme zusätzlich mit der Sequenzanalyse-Software *Seqscape* (*Applied Biosystems*) untersucht. Diese basiert auf dem Vergleich der ermittelten Sequenzen mit einer Referenzsequenz, wodurch mögliche Varianten erkannt werden und deren Konsequenz auf die Polypeptidkette angegeben wird, sofern der codierende Bereich eines Gens definiert wird. Durch den komplementären Vergleich der Sequenzen beider Richtungen werden ferner zufällige Sequenzartefakte, wie sie durch Hintergrund-Rauschen entstehen können, bewertet und ausgeblendet.

2.2.1.9 Restriktionsspaltung

Restriktionsspaltungen sind, sofern nicht anders angegeben, nach Herstellerangaben durchgeführt worden:

Enzym	Empfohlener Puffer	Vertrieb
Hind III	SuRE/Cut Buffer B	<i>Roche</i>
PaeI	Puffer B+	<i>Fermentas</i>
MboI	Puffer R+	<i>Fermentas</i>
BglII	Puffer O+	<i>Fermentas</i>
XbaI	Puffer Y+/Tango	<i>Fermentas</i>
MunI	Puffer G+	<i>Fermentas</i>
NheI	Puffer Y+/Tango	<i>Fermentas</i>
NcoI	Puffer Y+/Tango	<i>Fermentas</i>
Spe I	Puffer Y+/Tango	<i>Fermentas</i>

2.2.1.10 Auffüllen und Verdau von 5'- bzw. 3'-überhängenden Enden

5'- und 3'-überhängende Enden von Nukleinsäuren wurden mit der Klenow Polymerase-Einheit aufgefüllt bzw. abgetrennt. Hierzu wurden 2 Einheiten Klenow (*Roche*) und 10 µM dNTP mit DNA in Klenow-Puffer in einem Gesamtvolumen von 10 µl für 60 min bei 37°C inkubiert.

10x Klenow-Puffer: 0,5 M Tris/HCl, pH 7,6
 0,1 M MgCl₂

2.2.1.11 DNA-Dephosphorylierung

Zur Unterdrückung so genannter Religationen wurden 5'-Phosphatgruppen von linearisierten Klonierungsplasmiden durch Phosphatase-Reaktionen abgetrennt. Hierzu wurde linearisierte und aufgereinigte Plasmid-DNA mit 4 Einheiten alkalischer Phosphatase (*New England Biolabs*) in entsprechendem Puffer in einem Gesamtvolumen von 40 µl 120 min bei 37°C inkubiert.

2.2.1.12 Ligation von DNA zur Klonierung

DNA-Fragmente wurden in zuvor linearisierte Plasmidvektoren eingebracht, indem 9-90 fmol DNA-Insert mit 3-30 fmol dephosphoryliertem und linearisiertem Plasmidvektor ligiert wurden. Hierbei wurden die Fragmente mit 1 Einheit T4-DNA Ligase (*Fermentas*, St. Leon-Rot) und entsprechendem Puffer in 10 µl Gesamtansatz bei 16°C über Nacht inkubiert.

Zur Klonierung von PCR-Fragmenten in den pCR2.1-TOPO- oder pTEasy-Vektor wurden das *TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen)* bzw. das *pTEasy Cloning Kit* nach Herstellerangaben eingesetzt.

2.2.1.13 Plasmidisolierung aus *E. coli*-Bakterien (Mini-Präparation)

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Bakterien in kleinem Maßstab wurden 5 ml LB-Medium Kulturen mit entsprechendem Selektionsantibiotikum von einzelnen Bakterienklonen bei 37°C und 225 rpm über Nacht kultiviert. 1,5 ml Kultur wurden 1 Minute bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, 300 µl S1-Lösung hinzugegeben und resuspendiert. Die Bakterienlyse erfolgte durch Zufügen von 300 µl S2-Lösung und 5 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT). Zelluläre Proteine wurden durch Zusatz von 300 µl S3-Lösung und 10-minütiger Inkubation auf Eis ausgefällt. Nach Zentrifugation (15 min bei 12000 x g und 4°C) wurde der Oberstand mit 630 µl Isopropanol versetzt und 30 min bei 14000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70% Ethanol 10 min bei 12000 x g und 4°C gewaschen, bei 37°C getrocknet und anschließend in 50 µl H₂O aufgenommen. Die Plasmid-DNA wurde in der Folge mit Restriktionsendonukleasen oder Sequenzierung überprüft.

LB-Medium:	10g Pepton 5 g Hefeextrakt 170 mM NaCl ad 1 l pH 7,5 (autoklaviert)
S1-Lösung:	50 mM Tris-HCl 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A pH 8,0
S2-Lösung:	200 mM NaOH 1% (w/v) SDS
S3-Lösung:	2,8 M Kaliumacetat pH 5,1

2.2.1.14 Plasmidisolierung aus *E. coli*-Bakterien (Maxi-Präparation)

Die Isolation von Plasmiden in größeren Mengen geschah mit *XY Kit* (Macherey und Nagel, Düren), bei endotoxin-freien Präparationen mit dem *Endotoxin-Free Plasmid Isolation Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben.

2.2.1.15 DNA-Transformation durch Hitzeschock

Chemisch kompetente Bakterien wurden mit 15-100 ng Plasmid-DNA oder 2 µl Ligationsansätzen transformiert. Hierzu wurden 30 µl Bakterien mit der DNA 30 min auf Eis inkubiert bevor der Ansatz einem 30-sekündigem Hitzeschock bei 42°C unter-

zogen wurde. Die Bakterien wurden 2 min auf Eis inkubiert und dann mit 500 µl SOC Medium 60 min bei 37°C und 225 rpm inkubiert, bevor der Ansatz auf LB-Agar-Selektionsplatten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert wurde.

SOC-Medium: 2% (w/v) Pepton
 0,5% (w/v) Hefeextrakt
 10 mM NaCl
 2,5 mM KCl
 10 mM MgCl₂
 10 mM MgSO₄
 20 mM Glucose

2.2.2 RNA-Arbeitstechniken

2.2.2.1 RNA-Präparation

Gesamt-RNA wurde mit dem *RNeasy Mini Kit (Qiagen)* aus zuvor pelletierten Zellen nach Herstellerangaben extrahiert. Die Qualität dieser RNA wurde elektrophoretisch bestimmt. Zur Isolation kleiner Mengen durchflusszytometrisch sortierter Zellen wurde das *RNeasy Micro Kit (Qiagen)* nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.2.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Konzentration von verdünnten Lösungen wurde durch Messen der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Hierbei lag der Konzentrationsbestimmung folgende Formel zugrunde:

$$\text{RNA Konzentration} = \text{OD}^{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 \text{ } [\mu\text{g/ml}]$$

2.2.2.3 Reverse Transkription

Zur Generierung von komplementärer cDNA aus Gesamt-RNA wurde das *Omniscript RT-Kit* oder *Sensiscript RT-Kit (Qiagen)* verwendet. 1-3 µg Gesamt-RNA wurde mit 1 µM oligo-dT (*Qiagen*) bzw. 0,2 µM genspezifischen Oligonukleotiden, 1 mM dNTP, 40 Einheiten RNase-Inhibitor (*Promega*) und 4 Einheiten Reverser Transkriptase (*Qiagen*) in entsprechendem Puffer und einem Gesamtvolumen von 20 µl 60 min bei 37°C inkubiert.

2.2.2.4 Quantitative PCR (qPCR)

Die *real-time* PCR wurde mit Hilfe von *TaqMan*-Sonden und dem *ABI Prism 7900HT Sequence Detection System* (*Applied Biosystems*) durchgeführt. Hierfür wurden vom Hersteller entworfene und bereits validierte *Assays-on-Demand*TM (ICAM1 Hs00164932_m1, BIRC3 Hs00154109_m1, LTA Hs00236874_m1, GAPDH Hs99999905_m1) sowie der *TaqMan Universal PCR MasterMix, No AmpErase UNG* (*Applied Biosystems*) nach Herstellerangaben verwendet. Die Ansätze wurden mit je 0,67 µL cDNA (1:30 Verdünnung in PCR) in einem Gesamtvolumen von 20 µL mit dem Standardprogramm 10' 95°C/(15" 95°C/1' 60°C)x45 gemessen. Die Auswertung der qPCR erfolgte über die $\Delta\Delta C_t$ -Methode mit folgender Gleichung:

$$\Delta\Delta C_t = (C_t[GvI] - C_t[RG])_{\text{infizierte Probe}} - (C_t[GvI] - C_t[RG])_{\text{leer infizierte Probe}}$$

GvI = Gen von Interesse; RG = Referenzgen

2.2.3 Protein-Arbeitstechniken

2.2.3.1 Gesamtzellextrakt-Generierung

Zur Herstellung von Gesamtproteinzellextrakten wurden Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 300 x g und 4°C pelletiert. Abhängig von der Zellzahl wurde das Pellet in 50-300 µl RIPA-Puffer resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und dann 15 min bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert. Der von Zelltrümmern gereinigte Oberstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

RIPA-Puffer:	50 mM Tris/HCl, pH 7,2
	150 mM NaCl
	0,1% (w/v) SDS
	1% (w/v) Na-Desoxycholat
	1% (v/v) Triton X-100

2.2.3.2 Protein-Konzentrationsbestimmungen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Gesamtzellextrakten wurde der *Bio-Rad Protein-Assay* (*Bio-Rad*) verwendet. 1 µl Gesamtzellextrakt wurden mit 99 µl PBS=, 700 µl H₂O und 200 µl *Bio-Rad Protein-Assay* bei einer Wellenlänge von 595 nm im Photometer vermessen. Anhand einer BSA-Eichkurve bekannter Proteinkonzentrationen wurde die Proteinkonzentration in µg/µl ermittelt.

2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen wurde durch die so genannte SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter reduzierten Bedingungen im diskontinuierlichen System durchgeführt. Die Acrylamidkonzentration der verwendeten Trenngele lag bei 10% mit jeweils 4%igem Sammelgel. Es wurden je 30-100 µg Gesamtproteinextrakt pro Gelspur eingesetzt, die zuvor mit SDS-Gelladepuffer 5 min bei 95°C denaturiert wurden. Für die gelelektrophoretische Auftrennung wurde das *Mini-PROTEAN® 3 Cell-System (Bio-Rad)* in 1 x SDS-Laufpuffer verwendet.

5 x SDS-Laufpuffer:	125 mM Tris 125 mM Glycin 0,5% (w/v) SDS
SDS-Gelladepuffer:	50 mM Tris/HCl, pH 6,8 100 mM Dithiothreitol 2% (w/v) SDS 0,1% (w/v) Bromphenolblau 10% (v/v) Glycerin

2.2.3.4 Western-Blotting

Nach erfolgreicher Trennung wurden die Proteine auf eine Hybond-ECL Nitrocellulose-Membran (*Amersham-Biosciences*) übertragen. Hierzu wurde das *Semi-dry blotting*-Verfahren in einer *Trans Blot SD Zelle (Bio-Rad)* angewendet. Der Transfer erfolgte, nachdem die Membran zuvor in Blotpuffer equilibriert wurde, bei 1,5 mA/cm² Membranfläche für 120 min.

5 x Blotpuffer:	970 mM Glycin 125 mM Tris/HCl, pH 8,3
-----------------	--

2.2.3.5 Immundetektion

Die Nitrocellulosemembran wurde nach dem Elektrotransfer 1 h bei RT in 10% (w/v) Milchpulver in 0,1% (v/v) *Tween-20 TBS-Puffer* blockiert. Die Inkubation mit Primärantikörpern erfolgte in Verdünnungen von 1:500 bis 1:1000 des Antikörpers in 5% (w/v) Milchpulver in 0,1% (v/v) *Tween-20 TBS-Puffer* über Nacht bei 4°C unter ständigem Schwenken der Membran. Die Membran wurde dreimal in 0,1% (v/v) *Tween-20 TBS-Puffer* gewaschen, bevor sie mit dem *Horse radish peroxidase (HRP)* gekoppelten Zweitantikörper in 5% (w/v) Milchpulver in 0,1% (v/v) *Tween-20 TBS-Puffer* 1 h bei RT unter ständigem Schwenken inkubiert wurde. Die Membran wurde

erneut dreimal in 0,1% (v/v) *Tween-20 TBS-Puffer* gewaschen, bevor das *ECL Plus Western-Blotting Detection System (Amersham, GE Healthcare)* zur Detektion der Chemilumineszenz nach Herstellerangaben eingesetzt wurde. Mit der Membran wurde schließlich ein *Hyperfilm ECL (Amersham)* exponiert:

10x TBS-Puffer: 200 mM Tris
1,35 M NaCl

2.2.3.6 Herstellung von Gewebeschnitten

Von den Lymphknotenbiopsaten (Gefriermaterial) wurden 5 µm bis 7 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgebracht, welche dann nach 24 h Lufttrocknung bei –20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren wurden.

2.2.3.7 Immunfärbung von Gewebeschnitten

Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. 5 bis 7 µm dicke Gewebegefrierschnitte wurden aufgetaut und 6-12 h bei Raumtemperatur getrocknet. Die Schnitte wurden 10 min acetoxifixiert und anschließend 30 min vollständig getrocknet. Die Antikörper wurden in 1 x TBS-Puffer (1% BSA) verdünnt. Anschließend wird der Primärantikörper aufgetragen und 45 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 1 x TBS (5 min) wurden die Schnitte 30 min mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Es folgten weitere drei Waschschrte (5 min) und eine 30-minütige Inkubation mit streptavidin-gekoppelter alkalischer Phosphatase (*StreptABComplex, DAKO*). Nach erneutem, dreimaligem Waschen (5 min) wurde das *Fast Red-Substrat* zugegeben. Die Reaktion wurde unter dem Mikroskop beobachtet und durch Waschen in Wasser abgestoppt. Die Zellkerne werden mit Hämalaun nach Meyer gegengefärbt und ca. 5 min mit Wasser gebläut.

2.2.3.8 Mikrodissektion mittels *Laser Microbeam Microdissection (LMM)* und *Laser Pressure Catapulting (LPC)*

Die Mikromanipulation wurde mit dem *PALM® Robot-MicroBeam (PALM, Bernried)* mit dazu gehörigem Axiovert 200 Mikroskop (*Zeiss, Jena*) im Institut für Pathologie der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt/M durchgeführt. Die Gewebeschnitte werden nach dem Färben 2-3 h bei Raumtemperatur getrocknet (dehydriert). Für Einzelzell-PCR-Untersuchungen: Die 0,5 ml Reaktionsgefäße werden mit steril-

filtrierter 1%iger BSA-TBS-Lösung für 30 min inkubiert, um unspezifische Bindungen am Plastik abzusättigen.

In die abgeschnittenen Deckel der LPC-Mikrozentrifugenröhrchen (*PALM*) werden 20 µl 1 x *High Fidelity Puffer* (*Roche*) oder *Gentra Lysis Puffer* (*Qiagen*) vorgelegt. Die Deckel werden in die entsprechende Halterung am *PALM® Robot-MicroBeam* eingesetzt und auf die korrekte Position eingestellt. Die gewünschten Zellen werden bei 400facher Vergrößerung am Bildschirm mit der Computermaus markiert. Die Software wird auf *RoboLPC* eingestellt, wodurch die Zellen automatisch in einem Schritt ausgeschnitten und katapultiert werden. Die Katapultierung erfolgt durch einen Laser-Impuls unterhalb des eingestellten Fokus auf eine kleine Gewebebrücke, die zwischen der Zelle und ihrer Umgebung bestehen bleibt. Wird der Objektisch aus dem Sichtfeld gefahren, kann kontrolliert werden, ob sich die Zellen im Deckel befinden. Nach erfolgreichem LPC wird der Deckel vorsichtig aus der Halterung genommen und auf ein neues 0,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt, welches dann 2 min bei 15000 x g zentrifugiert wird. Nach der Zentrifugation sollte sich die Zelle im Puffer am Boden des Reaktionsgefäßes befinden. Die Zellen werden im Falle der Lagerung in PCR-Puffer bis zur weiteren Verwendung bei –20°C eingefroren oder, sofern in Lysis-Puffer gesammelt, bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.3.9 Gewinnung von peripherem Blut aus mononukleären Zellen (PBMC) mittels Ficoll-Dichtezentrifugation

Zur Gewinnung von peripherem Blut aus mononukleären Zellen (PBMC) wurden die Blutproben 1/3 mit PBS verdünnt. Diese wurde vorsichtig auf eine zuvor in einem passenden Reaktionsgefäß vorgelegten *Ficoll-Paque PLUS*-Lösung pipetiert, ohne dass es dabei zur Vermischung der beiden Lösungen kam. Die Menge der vorgelegten *Ficoll*-Lösung entsprach dabei etwa der Hälfte des Volumens der Blutverdünnung. Die so aufgeschichteten Blutproben wurden bei niedrigster Beschleunigung 30 min bei 250 g zentrifugiert. Die auf der *Ficoll*-Lösung entstandene Interphase, die die PBMC enthielt, wurde abgenommen, zweimal mit PBS gewaschen und bei 300 g für jeweils 15 min zentrifugiert. Zur Gewinnung von Granulocyten aus Blutproben wurde die untere *Ficoll*-Phase gesammelt und entsprechend gewaschen.

2.2.4 Zellkultur und Transfektionen

Zelllinie	Ursprung	Zelldichte (Zellen/ml)	Literatur
L-1236	HL peripheres Blut	$0,3 - 0,5 \times 10^6$	(Wolf et al. 1996)
L-428	HL Pleural-Erguss	$0,2 - 0,5 \times 10^6$	(Drexler 1993)
L-591	HL Pleural-Erguss	$0,5 \times 10^6$	(Drexler 1993)
HDLM 2	HL Pleural-Erguss	$0,5 - 1,0 \times 10^6$	(Drexler 1993)
KMH 2	HL Pleural-Erguss	$0,3 - 1,0 \times 10^6$	(Drexler 1993)
Karpas 1106P	PMBL	$0,5 - 1,0 \times 10^6$	(Nacheva et al. 1994)
Karpas 422	DLBCL	$0,5 - 1,0 \times 10^6$	(Dyer et al. 1990)
Raji	BL	1×10^6	(Pulvertaft 1964)
U 266	Multiples Myelom	$0,2 - 1,0 \times 10^6$	(Nilsson et al. 1970)
293	Embryonale Niere	$2 - 3 \times 10^6$	(Graham et al. 1977)

2.2.4.1 Kultivierung von Zellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden in einer 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre in Kultur gehalten. Zum Passagieren von 293-Zellen wurden diese nach Mediumentfernung mit 37°C warmem PBS gespült, anschließend mit Trypsin (2,5 mg/ml Trypsin-Lsg.) benetzt und sodann von der beschichteten Zellkulturschale gelöst. Ein Aliquot dieser Zellen wurde auf eine frische Zellkulturschale mit Medium gegeben. 293-Zellen wurden in *DMEM* (PAA, Pasching, Österreich), 10% FCS und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin kultiviert.

Suspensionszellen wurden in RPMI1640 versetzt mit Glutamax-1 (PAA), 20% FCS (PAA) und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin kultiviert. Je nach Zelllinie wurden die Zellen durch 10-minütige Zentrifugation bei 300 x g und 4°C gesammelt, je nach Zelllinie und zu erreichender Zelldichte wurde eine entsprechende Menge Medium abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt.

2.2.4.2 Zellzahlbestimmung

Die Anzahl der Zellen wurde durch Auszählen entsprechender Verdünnungen von Zellsuspensionen im Neubauer Hämatozytometer durchgeführt. Zur Unterscheidung vitaler von schadhafte Zellen wurde das gleiche Volumen einer 0,5%igen Trypanblau-Lösung zugegeben.

2.2.4.3 Durchflusszytometrische Analyse und Sortierung von Zellen (FACS)

Die durchflusszytometrische Analyse und Sortierung transfizierter und/oder transduzierter Zellen wurde an einem *FACS Canto*- bzw. *FACS DIVA*- Durchflusszytometer (*Becton Dickinson*, Heidelberg) durchgeführt. Die mittels Zentrifugation gesammelten Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, der Überstand abgesaugt und in 0,5-2 µl PBS aufgenommen. Tote oder apoptotische Zellen wurden mittels

Zugabe von 0,5 µg/ml Propidiumiodid erkannt und nicht in die Auswertung mit aufgenommen.

Der Nachweis der NGFR-Ausprägung auf transfizierten Zellen wurde mittels Immunfluoreszenz-Färbung mit einem Anti-CD271-Antikörper (*Miltenyi Biotec*, Bergisch Gladbach), der mit dem Farbstoff Allophycocyanin (APC) gekoppelt war, nach Herstellerangaben durchgeführt. Die so markierten Zellen wurden im FACS nachgewiesen.

2.2.4.4 Ermittlung der Puromycin-Konzentrationen zur Selektion von Zelllinien

Zur Ermittlung der Puromycin-Konzentrationen, die zur Selektion transfizierter Zellen verwendet wurde, wurden die entsprechenden Zelllinien mit 0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml oder ohne Puromycin für 5-10 Tage inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Verhältnis lebender Zellen zur Gesamtzellzahl mittels FACS-Messung unter Zugabe von 0,5 µg/ml Propidiumiodid untersucht. Es wurde jeweils die Puromycin-Konzentration zur Selektion verwendet, bei der nach 5-10 Tagen weniger als 5 % der Zellen lebten.

2.2.4.5 Transfektion von Lymphom-Zelllinien mittels des *Amaya*-Nucleofektions-System

RPMI1640-Zellkultur-Medium wurde auf Raumtemperatur gebracht und zur Kultivierung der transfizierten Zellen in ein passendes Kulturgefäß vorgelegt. Die Zellen wurden zentrifugiert (300 g, 10 min, 22°C) und der Überstand vollständig abgesaugt. $2-5 \times 10^6$ Zellen wurden in 100 µl der entsprechenden Nucleofektions-Lösung (*Amaya*, Köln) aufgenommen, in ein 1,5 ml steriles Reaktionsgefäß überführt und mit 2-5 µg des zu transfizierenden Plasmids durch Pipetieren gemischt. Die Zellsuspension wurde in Nucleofektionsküvette überführt und im *Amaya Nucleofector* mit entsprechendem Programm behandelt. Die DNA-Zellsuspension wurde in der Küvette mit Pasteurpipette mit etwas Medium vermischt und in das vorgelegte Medium überführt. Darauf folgte der Transfer der Zellen in geeignete Zellkulturbehälter.

Zur Ermittlung der geeigneten Transfektionsprotokolle wurden die zu untersuchenden Zelllinien mit dem *pmaxGFP-Plasmid* (*Amaya*) unter Verwendung unterschiedlicher Nucleofektions-Lösungen und Programmen des *Nucleofectors* transfiziert und 24 h kultiviert. Die Transfektionseffizienz wurde durch FACS-

Messung bestimmt. Diese ergab sich aus dem Verhältnis GFP-positiver Zellen zur gesamten Zellzahl.

Nucleofektions-Protokolle für HL- und NHL-Zelllinien

Zellen	DNA Menge [µg]	Zellzahl	Programm	Amaya-Lösung
U-266	2	2×10^6	X-005	C
Karpas-1106	5	2×10^6	U-001	T
Raji	2	2×10^6	M-013	V
L-1236	5	2×10^6	T-001	T
L-428	2	4×10^6	T-001	T
	2	1×10^6	X-001	L
KM-H2	5	2×10^6	T-001	T
Karpas 422	5	2×10^6	T-001	V

2.2.5 Lentivirale Arbeitstechniken

Alle Arbeiten mit den verwendeten Lentiviren unterliegen besonderen Sicherheitsbestimmungen der Stufe S2.

2.2.5.1 Erzeugung lentiviraler Ausprägungsplasmide

Das lentivirale Ausprägungskonstrukt pGIPZ-Spel wurde mittels PCR aus dem Ursprungsplasmid von pGIPZshRNA vertrieben von *Open Biosystems* unter Auslassung der Sequenzen des Puromycin-Resistenz-Gens und der shRNA erzeugt. Hierzu wurde das Originalplasmid mit XhoI (einmalige Restriktionsstelle im Puro-Gen) gespalten, die entstehenden überhängenden Enden abgedaut und mit Oligonukleotiden, die hinter der IRES und hinter der shRNA-Sequenz lagen, vermehrt. Diese Oligonukleotide besaßen zusätzlich eine SpeI-Erkennungsstelle. Die entstehenden Produkte wurden über Agarose-Gel-Elektrophorese isoliert, SpeI gespalten, ligiert und transformiert.

Das lentivirale Ausprägungskonstrukt pGIPZ-NheI wurde von dem zuvor erzeugten pGIPZ-Spel durch Restriktionsspaltungen und Ligationen erzeugt. Hierzu wurde durch gleichzeitige XbaI- und BsrGI-Spaltung die Plasmid-Sequenz 200 bp 5' des CMV-Promotors (XbaI) und 3 bp 3' des Stopp-Codons (BsrGI) des tGFP-Gens gespalten. Das entstandene Fragment wurde durch Agarose-Gel-Elektrophorese isoliert und in der Folge mit NcoI gespalten, dessen Schnittstelle in diesem Fragment einmalig 2 bp 5' des Start-Codons des tGFP-Gens lag. Das Fragment, das den Promotor enthielt, wurde durch Agarose-Gel-Elektrophorese isoliert und gemeinsam mit dem in der ersten Spaltung erzeugten Plasmid-Rückgrat und mit einem doppelsträngigen Linker-Oligonukleotid, das eine NheI-Stelle und überhängende Enden komplementär zu NcoI und BsrGI besaß, in äquimolarer Menge ligiert und transformiert.

2.2.5.2 Virusproduktion

Die verwendeten Viren wurden über Kotransfektion der Plasmide pGIPZ (codierend für das Virusgenom), psPAX2 (codierend für die viralen *gag* and *pol*-Proteine) und pMD2.G (codierend für das virale VSV-G-env-Protein), in 293-Zellen hergestellt. Hierfür wurden 5×10^6 293-Zellen in einer 10 cm Schale in 10 ml DMEM (PAA) ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit 10,5 µg Plasmidgemisch (pGIPZ: psPAX2: pMD2.G = 2,5:1,75:1) nach dem *GeneJuice-Protokoll* (Merck) transfiziert. Vier bis sechs h nach der Transfektion wurde das Kulturmedium abgenommen und gegen 6 ml RPMI (PAA) ausgetauscht. Der Virus wurde drei Tage nach der Transfektion geerntet. Hierfür wurde der Kulturüberstand abgenommen und steril filtriert. Der Virus wurde bei -80°C in kleinen Portionen gelagert.

2.2.5.3 Virustitration

Die Titration erfolgte mit Hilfe von 293-Zellen und unterlag der Annahme, dass ein Viruspartikel pro 293-Zelle benötigt wird, um sie zu infizieren und GFP-Expression detektieren zu können. Außerdem wurde angenommen, dass die verwendete Anzahl 293-Zellen am Tag der Infektion doppelt so hoch ist, wie am Vortag ausgesät. Je Virusüberstand wurden zwei verschiedene Virusverdünnungen im Duplikat angesetzt und vermessen. Hierfür wurden je Virus in vier Wells einer 24well-Platte je 1×10^5 293-Zellen ausgesät. Am Folgetag wurden die zwei verschiedenen Virusverdünnungen (z.B. 1:10, 1:50, 1:100, 1:200) in DMEM (Gesamtvolumen 500 µl) als Duplikat hergestellt. Von den ausgesäten 293-Zellen wurde das Medium abgesaugt und mit der Virusverdünnung ersetzt. Nach drei Tagen wurden die Zellen mechanisch aus den Wells gelöst, in PBS gewaschen, in PBS resuspendiert, mit Propidiumiodid versetzt und im FACS vermessen. Aus dem Anteil GFP-positiver Zellen lässt sich mit folgender Gleichung der Virustiter (VT) berechnen:

$$VT \left[\frac{\text{Viren}}{\text{mL}} \right] = \frac{\text{Anzahl}293\text{TZellen} \times \text{AnteilGFP} - \text{positiverZellen}}{\text{verwendetesVolumenVirus}[\text{mL}]}$$

2.2.5.4 Ultrazentrifugation

Virusüberstände mit geringem Titer wurden über Ultrazentrifugation konzentriert, anschließend wurde der Titer bestimmt. Die Ultrazentrifugation wurde bei 100.000 g für 2 h mit einem Festwinkel-Rotor Ti 70 in einer *Beckman Optima L-80 XP Ultrazentrifuge* (Beckman Coulter, Krefeld) im Institut für Virologie durchgeführt.

2.2.5.5 Infektion

In Testreihen wurde die optimale MOI (*multiplicity of infection*) der verschiedenen verwendeten Viren und Zelllinien bestimmt. Diese ergibt sich aus der Menge der zugegebenen Viruspartikeln, bei der die höchste Transformationseffizienz erreicht wird. Die Transformationseffizienz wird ausgedrückt durch das Verhältnis von GFP-positiven zu GFP-negativen Zellen. Für HL-Linien ergab sich eine MOI von 10. Die Zellen wurden wie folgt infiziert: Die Zellen werden bei der Infektion der entsprechenden Zelldichte gehalten. Die benötigte Anzahl Zellen wird abzentrifugiert und das Medium bis auf 1/5-1/10 des Infektionsgesamtvolumens abgesaugt. Das notwendige Volumen Virus (abhängig vom Virustiter, optimaler MOI und zu infizierender Zellzahl) wird zu den Zellen gegeben. Der Ansatz wird mit zur Hälfte konditioniertem und zur anderen Hälfte frischem RPMI bis zu der für die Zelllinien entsprechenden Zelldichte aufgefüllt. Konditioniertes Medium wurde zuvor von unbehandelten proliferierenden Kulturen der entsprechenden Zelllinien gewonnen. Dem Infektionsansatz wurden anschließend 0,5 µl/ml Polybren (Hexadimethrinbromid) zugefügt. Die Ansätze wurden in Zellkulturflaschen überführt und im Inkubator bis zur Analyse kultiviert.

3. Ergebnisse

3.1. Molekulare Charakterisierung von Ig-assoziierten Translokationen im cHL

Da HRS-Zellen in der Mehrzahl der Fälle von GC-B- oder Post-GC-B-Zellen abstammen, lag die Vermutung nahe, dass Ig-assoziierte Translokationen, wie sie in zahlreichen NHL auftreten, auch im HL vorkommen könnten (Küppers et al. 1994; Küppers et al. 2005). Vor Kurzem konnten in diesen im Tumorgewebe seltenen Zellen durch Interphase-zytogenetische Untersuchungen Bruchpunkte in Ig-Loci als Hinweis auf Ig-Translokationen identifiziert werden (Martin-Subero et al. 2006). Die dabei involvierten Gene ließen sich bislang jedoch nur in seltenen Fällen identifizieren. BCL6-Translokationen, assoziiert mit dem Ig-Locus oder anderen Genen, wie sie häufig in L&H-Zellen des NLP HL zu finden sind, scheinen im cHL eine eher untergeordnete Rolle zu spielen (Wlodarska et al. 2003; Renne et al. 2005; Martin-Subero et al. 2006). Auch weitere Kandidatengene, wie z.B. Cyclin-D1, BCL2 oder MYC, vielfach beteiligt an Ig-Translokationen in NHL, ließen sich nicht oder nur in sehr seltenen Fällen nachweisen.

3.1.1. Analyse der chromosomalen Translokation t(10;14) (q11;q32) in der HL-Zelllinie L-1236

Im Rahmen einer zuvor angefertigten Diplomarbeit wurde durch LDI (*long distance inverse*)-PCR in der HL-Zelllinie L-1236 eine IgH-Translokation entdeckt, bei der die Switch- μ -Region mit der chromosomalen Region 10q11 verbunden ist (zum Prinzip der LDI-PCR siehe Abschnitt 2.2.1.3). Die genaue Lokalisation dieses Translokationsbruchpunktes und ein möglicher reziproker Bruchpunkt auf dem zweiten derivativen Chromosom konnte zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht ermittelt werden. Basierend auf dem klonierten Bruchpunkt wurden in dieser Arbeit durch eine Kombination von RACE-PCR und PCR mit genomischer DNA beide Translokationsbruchpunkte charakterisiert.

Southern-Blot-Analysen zur Ig-Klassenwechselrekombination dieser HL-Zelllinie wiesen darauf hin, dass ein möglicher reziproker Bruchpunkt in dem am weitesten stromabwärts der IgV-Gene gelegenen Schwerekettensegment IgH α 2 liegen könnte (Irsch et al. 2001). So war der Sequenzabschnitt des IgH-Allels, welches in die Translokation involviert ist, zwischen der Switch- μ -Region und der vom IgV-Genen am weitesten 3' gelegenen Switch- α 2-Region der konstanten Gene deletiert.

Im Falle von klassenwechsel-assoziierten Ig-Translokationen in NHL lassen sich häufig Fusionstranskripte, bestehend aus Sequenzen des Ig-Locus und der Sequenz des Partnergens nachweisen (Ye et al. 1995; Fenton et al. 2002). Aus diesem Grund wurde ein möglicher Translokationsbruchpunkt in Ig α 2 durch RACE-PCR und Einsatz von intron-überspannenden Oligonukleotiden für diese Region untersucht.

Mit Hilfe dieses Ansatzes konnte ein offensichtlich schwach ausgeprägtes Fusionstranskript der Länge von 250 bp, bestehend aus IgH α 2-Locus und Abschnitten des Chromosoms 10q11 nachgewiesen werden, das erwartungsgemäß im Abgleich auf genomischer DNA eine unterbrochene Abfolge zeigte. Der Sequenzabschnitt dieses Fusionstranskripts, der aus Sequenzen des Chromosoms 10q11 bestand zeigte in 4 Regionen in dieser chromosomalen Bande starke Homologien zwischen 93%-96%. Während in drei der ermittelten homologen Regionen kein mögliches Gen annotiert war, passte eine dieser Homologien zu dem in der Gen-Datenbank des Weizmann-Instituts aufgelisteten Eintrag LOC644021. Dieser Eintrag bezieht sich auf eine Gen-Vorhersage und ist zu 99% homolog zu einer Sequenz, die den Eintrag CTSL2 für Cathepsin L-ähnliches 2 Gen beinhaltet. Diese Sequenz befindet sich ebenfalls in der chromosomalen Bande 10q11. Transkripte von CTSL2 sind erstmals vor etwa 15 Jahren beschrieben worden und mittels Homologievergleich als Cathepsin L-ähnliches Pseudo-Gen klassifiziert worden (Bryce et al. 1994). Außer der starken Homologie zu Cathepsin L ist jedoch bislang nichts über diese Pseudo-Gen bekannt. Versuche mittels RACE-PCR ein Fusionstranskript, initiiert aus Sequenzen der Switch- μ -Region des zuvor bekannten Bruchpunktes, waren nicht erfolgreich.

Tabelle 1a: Ergebnis des Datenbankvergleichs der Translokationsbruchpunkt-Sequenz ausgehend von sp

Start der Homologie der ermittelten Sequenz	Ende der Homologie der ermittelten Sequenz	Position ¹	Position ¹	Identität ¹	Chromosom	Länge der Sequenz	Strang
180	6418	46.689.254	46.695.505	99,6%	10	6418	+
180	6418	47.773.879	47.780.130	99,5%	10	6418	-
180	6418	46.208.434	46.214.679	99,5%	10	6418	+
180	6418	48.598.194	48.604.439	99,5%	10	6418	+
2	178	105.397.600	105.397.778	95,9%	14	6418	-

Die Bruchpunkt-überspannenden Sequenzen bestehen am 5'-Ende aus Sequenzen der Switch- μ -Region. Der 3' gelegene Abschnitt der Sequenzen, der der chromosomalen Bande 10q11 zugeordnet ist, zeigt starke Homologie zu vier Positionen in dieser Region. Drei dieser Homologien liegen dabei auf demselben Strang, d.h. verlaufen in dieselbe Richtung. Durch die Kombination dieser Orientierungen mit denen des reziproken Bruchpunktes konnte die genaue Lokalisation des Bruchpunktes bestimmt werden.

Die entsprechenden Positionen der Bruchpunkte auf der ermittelten Sequenz und der dazugehörigen Homologien, ermittelt aus dem paarweisen Vergleich, sind fett markiert. Die Nummerierung der Bruchpunkt-überspannenden Sequenzen (1. und 2. Spalte) entspricht Abbildung 4 (grüner Balken).

¹zahlreiche Punktmutationen und mehrere 1-8 p Deletionen im Vergleich zur publizierten Sequenz

Tabelle 1b: Ergebnis des Datenbankvergleichs der Translokationsbruchpunkt-Sequenz ausgehend von α

Start der Homologie der ermittelten Sequenz	Ende der Homologie der ermittelten Sequenz	Position ¹	Position ¹	Identität ¹	Chromosom	Länge der Sequenz	Strang
1	3099	48.601.079	48.604.167	98,4%	10	4377	-
1	3099	46.692.139	46.695.224	98,2%	10	4377	-
1	3099	47.774.162	47.777.247	98,3%	10	4377	+
1	3099	46.211.319	46.214.407	98,1%	10	4377	-
3097	4377	105.125.543	105.126.856	98,6%	14	4377	-

Die Bruchpunkt-überspannenden Sequenzen bestehen am 5'-Ende aus Sequenzen der chromosomalen Bande 10q11, die wie beim Vergleich der reziproken Bruchpunkt-Sequenz Homologien zu vier Positionen in dieser Region aufweisen. Der 3' gelegene Abschnitt der Sequenzen besteht aus Sequenzen der Switch- α -Region.

Die entsprechenden Positionen der Bruchpunkte auf der ermittelten Sequenz und der dazugehörigen Homologien, ermittelt aus dem paarweisen Vergleich, sind fett markiert. Die Nummerierung der Bruchpunkt-überspannenden Sequenzen (1. und 2. Spalte) entspricht Abbildung 4 (grüner Balken).

¹zahlreiche Punktmutationen und mehrere 1-8 p Deletionen im Vergleich zur publizierten Sequenz

Der durch den Nachweis der Fusionstranskripte ermittelte reziproke Bruchpunkt der zuvor beschriebenen Translokation wurde auf genomischer DNA der L-1236 Zelllinie bestätigt. Von den Translokationsbruchpunkten der beiden derivativen Chromosomen wurden in der Folge PCR-Produkte der Länge 6,5 kb im Falle der Switch- μ -assoziierten Translokation und der Länge 4,7 kb im Falle der Switch- α 2-assoziierten Translokation erzeugt und kommerziell mittels der *primer-walking-Methode* sequenziert (Tabelle 1 a+b):

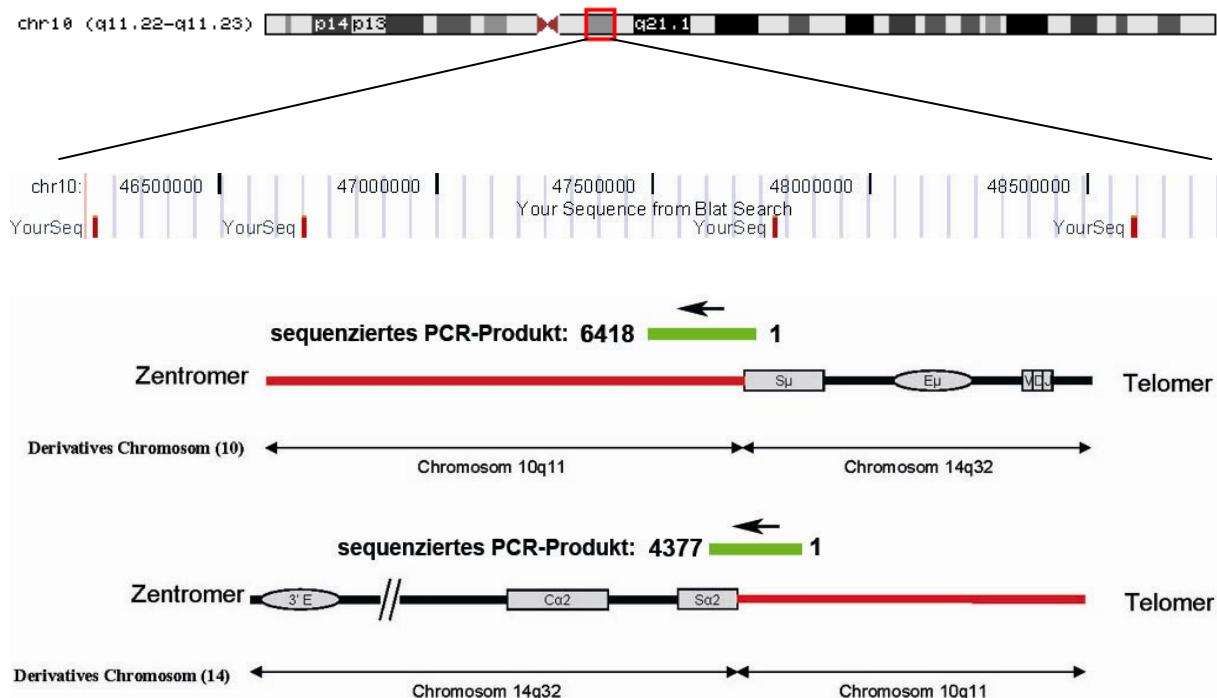


Abbildung 4: Struktur der Ig-assoziierten Translokation des chromosomalen Bereichs 10q11. Oben: Ideogramm des Chromosoms 10 mit dem Ausschnitt der chromosomalen Bande 10q11 und den Regionen der in den Tabellen 1a und 1b gezeigten Homologien. Wie in den Tabellen 1a und 1b zu erkennen ist, liegen jeweils die vier Homologien der beiden Bruchpunkte in denselben Regionen. Unten: Schematische Abbildung der aus der Translokation resultierenden derivativen Chromosomen mit den Bruchpunkten in Ig-Switch- μ und Ig-Switch- α . Die sequenzierten Bruchpunkt-überspannenden PCR-Produkte sind durch grüne Balken dargestellt und entsprechend der Tabelle mit Nummern bezeichnet. Die Pfeile verdeutlichen zusätzlich die Orientierung dieser Sequenzen.

Auffällig war dabei die Tatsache, dass beide Sequenzen der unterschiedlichen Translokationsbruchpunkte jeweils 4 Treffer fast identischer Homologien erbrachten. Eine mögliche Erklärung liegt darin, dass in der chromosomalen Region 10q11-10q23 im Laufe der Evolution zahlreiche segmentale intrachromosomale Duplikationen stattgefunden haben (Guy et al. 2000; Deloukas et al. 2004).

Aus den Sequenzen der Translokationsbruchpunkte wurde ersichtlich, dass die verschiedenen Homologien teilweise auf verschiedenen Strängen des Chromosoms 10 lokalisiert waren. Der Vergleich der Orientierung dieser je 4 Sequenz-Homologien beider Translokationsbruchpunkte auf Chromosom 10q11 führte schließlich zur Aufklärung ihrer Lokalisation (Tabelle 1a+b).

Die Sequenzen der PCR-Produkte beider Translokationsbruchpunkte besitzen jeweils die gleiche Orientierung, d.h. beginnend von den Telomeren der beiden derivativen Chromosomen in Richtung Zentromere orientiert (Abbildung 4). Da nur eine korrekte Verbindung aus Telomer und Zentromer beider Chromosomen stabil vererbt werden kann, sollten beide Sequenzen zum gleichen Strang des Chromosoms 10 homolog sein. Dies setzt die Annahme voraus, dass es im Verlauf der Translokation an keinem der beiden Bruchpunkte zu einer internen chromosomalen Inversion gekommen ist. Unter dieser Bedingung müsste einer der beiden Bruchpunkte auf Chromosom 10 entweder mit μ oder $\alpha 2$ fusioniert an der Position 47.780.130 oder 47.777.247 liegen. Diese Feststellung beruht darauf, dass nur so eine Kombination der Bruchpunkte der beiden derivativen Chromosomen möglich wäre, die in derselben Orientierung verlaufen, d.h. zum selben Strang homolog sind.

Die Frage, ob μ mit der Position 47.780.130 oder α mit der Position 47.777.247 verbunden ist, erklärt sich aus der Betrachtung der korrekten Telomer/Zentromer-Verbindung (Abbildung 4). Der Teil des langen Arms von Chromosom 14, auf dem μ -gelegen ist, besitzt ein Telomer. Dieser chromosomale Abschnitt muss also mit dem Zentromer des Chromosoms 10 verbunden sein. Entsprechend muss der chromosomale Abschnitt des Chromosoms 14, auf dem α gelegen ist, mit dem Telomer des langen Arms des Chromosoms 10 verbunden sein.

Von der Position 47.780.130 (Bruchpunktsequenz μ) aus betrachtet, werden die Zahlen kleiner. Das heißt, die Sequenz des Chromosoms 10 ausgehend vom Bruchpunkt verläuft in Richtung Zentromer. Demgemäß muss dies die Position des Translokationsbruchpunktes sein, der mit μ -verbunden ist. In der Konsequenz muss der zweite Bruchpunkt auf Chromosom 10, der mit $\alpha 2$ verbunden ist, an der Position

48.601.079 liegen. Dies bedeutet, dass im Verlauf der Translokation eine Deletion auf 10q11 von etwa 800 kb stattgefunden haben muss. Tatsächlich konnte dies später durch die von einer Kooperationsgruppe durchgeführte Analyse der vergleichenden Genom-Hybridisierung der L-1236-Zelllinie bestätigt werden (Abbildung 5).

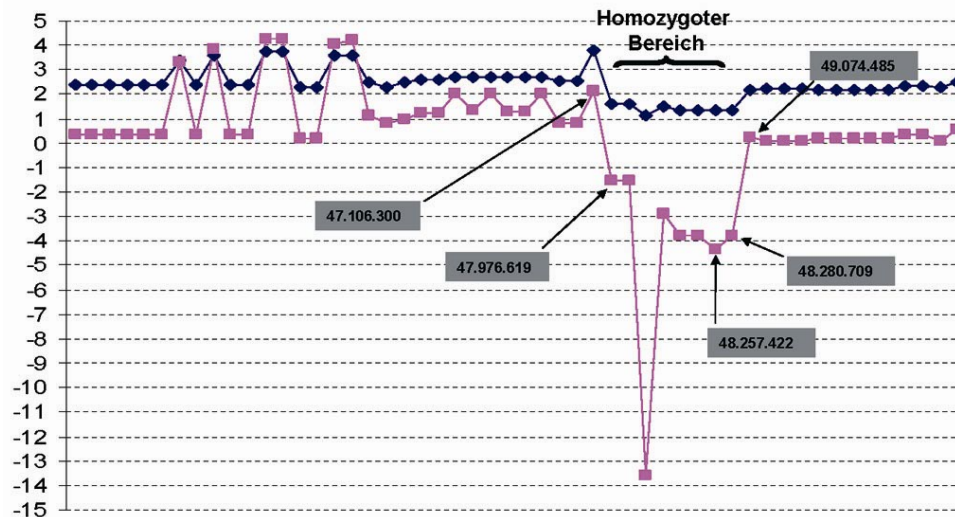


Abbildung 5: Ergebnisse der aCGH-Analyse einer Kooperationsgruppe bestätigen eine Deletion von 800 kb der chromosomalen Region 10q11 in der L-1236-Zelllinie. Die durch die aCGH ermittelte Kopienzahl an den jeweiligen Positionen ist in Rosa angegeben. Die blauen Punkte geben die mittels Software geglätteten Werte an den entsprechenden Positionen an. Die Pfeile und dazugehörigen Zahlen geben die Basen-Positionen der chromosomalen Region 10q11 an. Die durch die aCGH ermittelten über oder unter 2 resultierenden Werte der Kopienzahl sind bedingt durch Polyploidie in einem Teil der Zellen der L-1236-Zelllinie.

Dem chromosomalen Bereich 10q11 sind vergleichsweise wenige Gene zugeordnet (Guy et al. 2000; Deloukas et al. 2004). Wie auch durch die RACE-PCR gezeigt werden konnte, befindet sich direkt an beiden Translokationsbruchpunkten kein Gen mit eindeutiger Funktion.

Infolge von Ig-assoziierten Translokationen können jedoch auch Gene verstärkt ausgeprägt werden, die in einiger Entfernung zum Translokationsbruchpunkt liegen. Daher wurden die im Rahmen eines anderen Projekts angefertigten globalen Genausprägungs-Profile von HL-Zelllinien und primären HL-Fällen auf die Ausprägung der annotierten Transkripte in einem Bereich von ca. 500 kb 5' bis ca. 500 kb 3' der Translokationsbruchpunkte inklusive der deletierten Region des Chromosoms 10 qualitativ untersucht. Keines der untersuchten Transkripte zeigte dabei eine besonders starke Ausprägung. Ferner ist für keines der in mehr als 50% der HL ausgeprägten Transkripte eine Funktion beschrieben.

Aufgrund der komplexen Struktur des chromosomalen Bereichs 10q11, sind die Positionen der untersuchten Transkripte nicht eindeutig zugeordnet. Das bedeutet, dass identische Transkripte in der Mehrzahl der Fälle der untersuchten

putativen Gene zusätzlich auch anderen Bereichen dieses Chromosoms zugeordnet sind. Laut der Datenbank der Universität von Kalifornien, Santa Cruz sind nur die Gene RBP3, GDF2 und GDF10 einmalig in dem chromosmalen Bereich 10q11-q23 vorhanden. Alle diese Gene liegen dabei in der monoallelisch deletierten Region auf Chromosom 10q11. RBP 3 codiert ein Retinol bindendes Protein, das in Photorezeptorzellen ausgeprägt wird (Gonzalez-Fernandez 2003). Die wenig charakterisierten Gen-produkte der Gene GDF2 und GDF10 gehören zur Familie der TGF- β -Zytokinen und scheinen an Differenzierungsprozessen von Osteoblasten während der Knochen-entwicklung mitzuwirken (Urist et al. 1987).

Aufgrund der Assoziation der Gen-Produkte von GDF2 und GDF10 zu Zytokin-Signalwegen und der Tatsache, dass ihr Gen-Locus in L-1236 monoallelisch deletiert ist, wurden alle codierenden Exon-Gene von genomischer DNA der HL-Zelllinien L-1236, HDLM-2, KM-H2 und L-428 sequenziert. Diese Sequenzen erbrachten jedoch keine Variation zu den publizierten Sequenzen.

Zusammenfassend zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse, dass aufgrund der Assoziation der Translokationsbruchpunkte mit zwei Ig-Switch Bereichen die identifizierte Ig-Translokation im Rahmen eines fehlerhaften Klassenwechsels stattgefunden hat. Dies geschah vermutlich während der GC-Reaktion in einer Vorläuferzelle der HRS-Zellen, aus dem die L-1236-Zelllinie etabliert wurde. Ein mögliches Kandidatengen, codierend für ein Protein oder eine regulatorische microRNA, die durch die Translokation fehlreguliert einen Beitrag zur Entstehung dieses HL beigetragen hat, konnte bislang nicht identifiziert werden

3.1.2. Molekulare Charakterisierung IgH-assoziierter Translokationen in primären HRS-Zellen

In Vorarbeiten zu dieser Arbeit wurde ein LDI-PCR-Protokoll etabliert, das den Nachweis von Translokationen in den IgH-Locus mit sehr geringen Ausgangs-Zellmengen ermöglicht. Dieses wurde auf primäre HL angewendet, bei denen in Voruntersuchungen mittels Interphase-zytogenetischen Studien durch eine Kooperationsgruppe IgH-Translokationen nachgewiesen wurden. Von vier solcher Fälle wurden die HRS-Zellen durch CD30-Ausprägung und morphologischer Kriterien identifiziert und einzeln laser-mikrodissektiert. Je Fall wurden etwa 1000 bis 2000 Zellen in Gruppen von etwa 250 Zellen gesammelt. Die DNA aus diesen Zellen wurde entweder direkt der LDI-PCR zugeführt oder diese unspezifisch voramplifiziert.

Dieser Schritt geschah mittels der DNA-Strang-Verdrängungs-Amplifizierung durch die DNA-Polymerase des Bakteriophagen $\phi 29$ und kurzen Oligonukleotiden zufälliger Zusammensetzung. Mit Hilfe dieser Methode, können aus etwa 90 Kopien des Genoms DNA-Mengen bis zu 33 ng der durchschnittlichen Länge von 10 kb synthetisiert werden (Dean et al. 2001). Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass sich, sofern die zugegebene DNA Menge gering ist, in großen Mengen unspezifische DNA-Moleküle bilden.

Von zwei der HL-Fälle wurde aus den ca. 750 und 1000 mikrodisezierten HRS-Zellen DNA gewonnen, voramplifiziert und durch die LDI-PCR für den JH- und Switch- μ -Locus untersucht. In keiner dieser Reaktionen konnte ein Produkt beobachtet werden. Wie sich durch eine PCR-Untersuchung der voramplifizierten DNA mit einem Produkt der Länge von ca. 3 kb herausstellte, könnte dies auf die geringe Qualität der DNA zurückzuführen sein. So wurden in diesen Kontrollreaktionen ebenfalls keine Produkte beobachtet. Eine Switch- μ -LDI-PCR mit DNA, die direkt aus 250 HRS-Zellen von einem der Fälle isoliert wurde, blieb ebenfalls ohne Ergebnis.

Ein weiterer Fall der vier untersuchten Fälle war sehr reich an HRS-Zellen. Aus diesem Grund gelang es einer Kooperationsgruppe, karyotypische Analysen von HRS-Zellen an diesem Fall durchzuführen. Diese erbrachten Hinweise auf eine Ig-assoziierte Translokation mit Beteiligung des CIITA-Genlocus in der chromosomalen Bande 16p13. Translokationen unter Beteiligung von CIITA wurden bereits in DLBCL beschrieben (Yoshida et al. 1999). Hierbei wurden Fusionen mit dem BCL6-Genlocus identifiziert. Interessanterweise sind beide Gene Ziele aberranter somatischer Hyper-mutation in DLBCL (Klein und Dalla-Favera 2008). Die Bruchpunkte dieser Trans-lokationen liegen dabei in einer Region, die sich etwa 1 kb flussabwärts der Promotoren beider Gene erstreckt (Akasaka et al. 2003).

Das CIITA-Gen besitzt im Menschen drei gewebspezifische Promotoren und codiert für einen Faktor, der die Ausprägung von MHCII-Klasse-Molekülen und zahlreichen Faktoren, die in der Antigen-Präsentierung involviert sind, kontrolliert (Wright und Ting 2006).

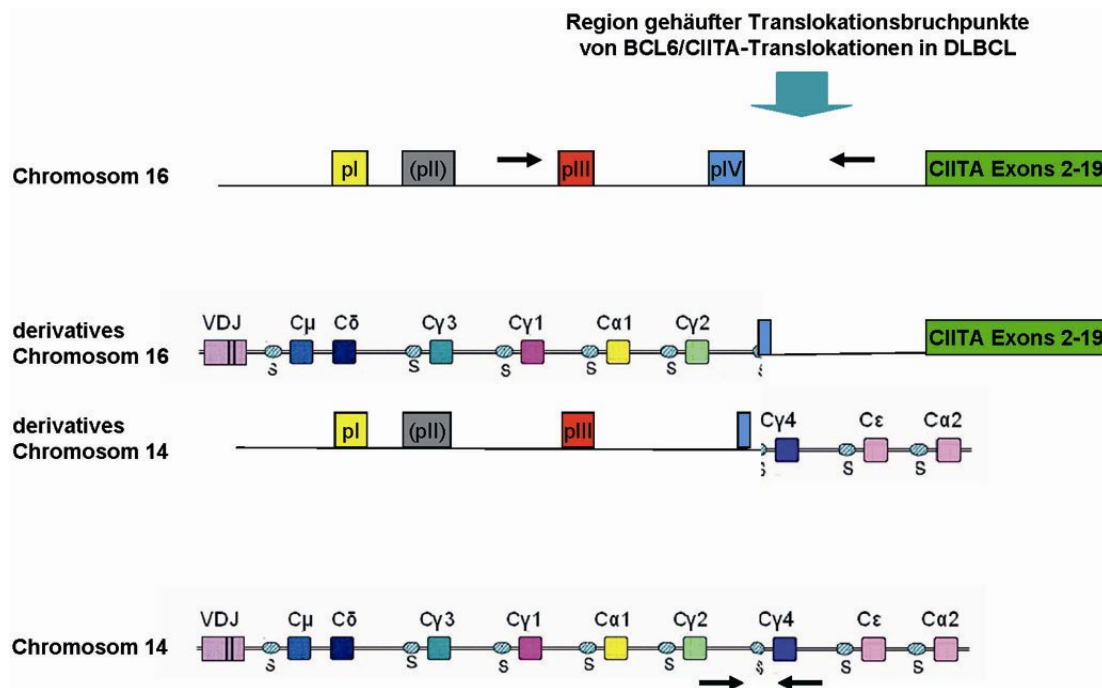


Abbildung 6: Struktur der Ig-assoziierten CIITA-Translokation in HRS-Zellen eines primären HL. Oben: CIITA-Genlocus mit den im Menschen 3 aktiven, gewebespezifischen Promotoren mit vorgelagerten, alternativen nicht-codierenden Exons 1 (pI, pII und pIV) und codierenden Exons. Die Region gehäufter Bruchpunkte in BCL6-assoziierten Translokationen umfasst einen Bereich von pIV ca. 1kb flussabwärts. Mitte: Derivate Chromosomen der Ig-assoziierten Translokation in HRS-Zellen mit jeweils den Bruchpunkten in Switch- γ und in pIV. Am Bruchpunkt des derivativen Chromosoms 14 zeigte sich eine ca. 160 bp umfassende Deletion in der Sequenz dieses Promotors. Unten: IgH-Locus mit VDJ-Umlagerung und den konstanten Gensegmenten (C) und vorgelagerten Switch-Regionen (S). Die Pfeile im IgH- und CIITA-Gen-Locus geben die Positionen der zur Bruchpunktklonierung verwendeten Oligonukleotide an.

Vor diesem Hintergrund wurde ein möglicher Translokationsbruchpunkt unter Beteiligung der häufigen Bruchpunkt-Regionen des CIITA-Genlocus und der Switch-Regionen des IgH-Locus mittels direkter PCR an HRS-Zellen dieses Falls untersucht. So konnte ein Produkt gewonnen und sequenziert werden, mit dem eine Fusion der Switch- γ 4-Region mit dem CIITA-Genlocus nachgewiesen wurde. Durch eine weitere PCR wurde auch der reziproke Bruchpunkt dieser Translokation identifiziert, bei dem der verbleibende Teil der Switch- γ 4-Region mit dem Abschnitt des CIITA-Genlocus, der flussaufwärts des andern Bruchpunkts liegt, verbunden war. In den Sequenzen der beiden untersuchten Bruchpunkte waren jeweils auf beiden Seiten der Bruchpunkte Punktmutationen zu erkennen. Die Bruchpunkte des CIITA-Genlocus lagen jeweils in Promotor VI des CIITA-Gens, wobei in dem Bruchpunkt des derivativen Chromosoms 14 ca. 160 bp dieses Promotors deletiert waren.

Die Konsequenzen dieser Translokation auf die Ausprägung von CIITA in den HRS-Zellen des untersuchten HL blieben unklar. CIITA-Protein lässt sich auf primärem Gewebe immunhistochemisch aufgrund fehlender Antikörper nicht nachweisen.

Jedoch konnten per immunhistochemischer Färbung dieses HL durch eine Kooperationsgruppe MHCII-Proteine auf der Oberfläche der HRS-Zellen nachgewiesen werden. Dies ist ein typischer Befund für HRS-Zellen. Vermutlich ist die Ausprägung von MHCII-Molekülen auf der Oberfläche dieser Zellen einer der Mechanismen der Interaktion mit den sie umgebenden T-Zellen des Tumor-Mikromillieus.

Um die allelspezifische Ausprägung des CIITA-Gens in den HRS-Zellen dieses HL zu analysieren, wurden Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) in der codierenden Region des CIITA-Gens gesucht, die heterozygot verteilt vorliegen sollten. Die quantitative Analyse der unterschiedlichen polymorphen Varianten in den CIITA-Transkripten in HRS-Zellen dieses Falls sollte so Aufschluss über die allelspezifische Ausprägung ermöglichen. Jedoch wurde ein solcher SNP in diesem Fall nicht identifiziert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in einem der vier untersuchten primären HL-Fälle ein Translokationsbruchpunkt mit Beteiligung zweier Switch-Regionen identifiziert werden konnte. Dieser hat vermutlich während der GC-Reaktion in einer HRS-Vorläufer-Zelle dieses HL stattgefunden. Die Translokationsbruchpunkte in den Switch- γ 4-Regionen des Ig-Locus und die identifizierten Punktmutationen auf beiden Seiten der jeweiligen Bruchpunkte deuten darauf hin, dass dieses Ereignis im Laufe der Klassenwechselrekombination, vermutlich AID-induziert, stattgefunden hat. Die Doppelstrangbrüche auf Seite des CIITA-Genlocus, die zu einer Translokation dieses Gens in den Ig-Locus geführt haben, sind vermutlich ebenfalls AID-induziert, bedingt durch den Prozess der aberranten somatischen Hypermutation.

Die Frage, ob eine verstärkte oder verminderte Ausprägung des CIITA-Gens infolge der Kontrolle des Ig-Locus vorliegt und dies eine Ursache für die starke MHCII-Ausprägung ist, kann nicht beantwortet werden.

3.2. Gemeinsame und separate transformierende Ereignisse in klonal verwandten Kombinationslymphomen

In seltenen Fällen sind bei Patienten das Auftreten von HL und NHL zu beobachten, die gleichzeitig oder zeitlich getrennt voneinander auftreten können. Diese Kombinationslymphome sind häufig klonal miteinander verwandt, wie der Nachweis identischer Ig-Umlagerungen in beiden Lymphomen zeigt (Bräuninger et al. 2006). Interessanterweise lassen sich in vielen dieser Fälle gemeinsame und individuelle

klonale somatische Mutationen in den IgV-Genen der verschiedenen Lymphome nachweisen. Dies weist daraufhin, dass beide Lymphome von einer gemeinsamen (möglicherweise prä malignen) Vorläufer-Zelle abstammen, und dass die Entwicklung in die verschiedenen Lymphome teilweise oder ganz im GC stattgefunden haben muss (Abbildung 7). Eine (vermutlich) therapieinduzierte Transformation eines bereits voll entwickelten Lymphoms in ein anderes Lymphom, wie sie häufig stattfindet, kann bei dieser Konstellation ausgeschlossen werden (Tabelle 2). Die Analyse transformierender Ereignisse bei Kombinationslymphomen bietet daher die Gelegenheit, Einblicke in die Mehrschritt-Pathogenese von HL und NHL zu erhalten. Außerdem bietet sie die Möglichkeit, mittels sequenzieller Analysen der NHL und daraus resultierenden gezielten Untersuchungen der zugehörigen HL, Fragestellungen im HL in Form von Kombinationslymphomen zu erörtern, die aufgrund ihres hohen Materialbedarfs im Regelfall nur schwer durchzuführen sind.

Zu diesem Zweck wurden sechs klonal verwandte Kombinationslymphome bestehend aus HL und NHL (Tabelle 2) auf transformierende Ereignisse untersucht, die in der jeweiligen Pathogenese des entsprechenden Lymphoms eine Rolle spielen.

Tabelle 2: Charakteristika der untersuchten klonal verwandte Kombinationslymphome

Fall	Lymphome	HL und NHL im selben Biopsat	Mutierte IgV- Gene	Gemeinsame und separate IgV-Gen-Mutationen	EBV
1	HL	+	+	+	-
	FL		+		-
2	HL	+	+	+	-
	FL		+		-
3	HL	+ ¹	+	+	-
	B-CLL		+		-
4	HL	- ¹	-	-	-
	SMZL		-		-
5	HL	+ ¹	+	Nur separate	+ (1 Sub-Klon)
	MCL		-		-
6	HL	+	+	+ ²	-
	DLBCL		+		-

Die klonale Verwandtschaftsbeziehung der jeweiligen Lymphome der untersuchten Kombinationslymphome wurde in vorherigen Studien durch den Nachweis identischer IgV-Gen-Umlagerungen demonstriert. In der Mehrzahl der Fälle finden sich in beiden Lymphomen gemeinsame und separate IgV-Gen-Mutationen, was auf eine Entwicklung dieser Lymphome aus einer gemeinsamen Vorläufer-Zelle im GC schließen lässt. In Fall 5 wurde ein EBV-positiver HRS-Subklon identifiziert.

¹ Diagnose der NHL 3-15 Jahre vor der Diagnose der Kombinationslymphome (Tinguely et al. 2003).

² Hinweise auf zwei Kopien desselben IgV-Gens mit unterschiedlichem Mutationsmuster (Rosenquist et al. 2004a).

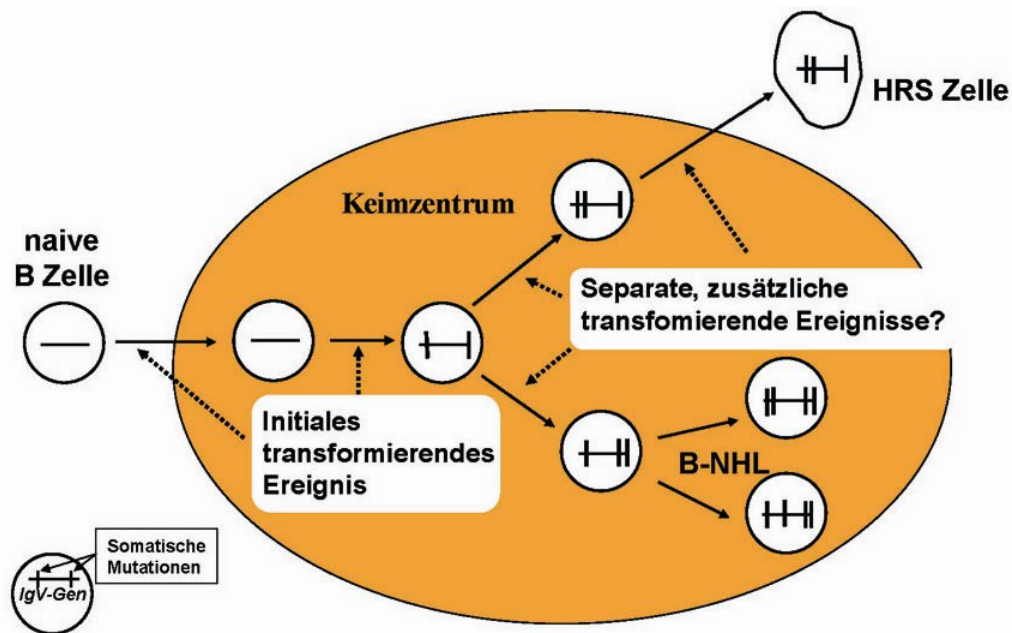


Abbildung 7: Szenario der Entstehung klonal verwandter Kombinationslymphome. Aus dem IgV-Gen-Mutationsmuster lässt sich die mögliche Entstehung klonal verwandter Kombinationslymphome ableiten: Demnach erwirbt eine möglicherweise bereits (prä-)maligne Vorläufer-B-Zelle im GC in mehreren Runden intensiver Proliferation somatische Mutationen ihrer IgV-Gene. Während dieser Proliferations-Runden des gemeinsamen Lymphom-Vorläufers finden transformierende Ereignisse statt, die zur Trennung der Entwicklung der beiden Lymphome führen und schließlich nach vermutlich weiteren separaten transformierenden Ereignissen in der Entstehung zweier verschiedener Lymphome münden.

3.2.1 IgH-assoziierte Translokationen in Kombinationslymphomen aus HL und FL sowie HL und MCL

VDJ-rekombinations-assoziierte Translokationen unter Beteiligung von BCL2 beziehungsweise BCL1 sind ein Kennzeichen für FL bzw. MCL (Küppers et al. 2005). Daher sollte die Frage erörtert werden, ob die vorliegenden Kombinationslymphome aus HL und FL bzw. MCL diese Translokationen aufweisen. Eine von einer Kooperationsgruppe durchgeführte bruchpunktüberspannende BCL2- bzw. BCL1-Standard-PCR führte zu keinem Ergebnis. Durch die Anwendung der JH-LDI-PCR wurden aus Ganzschnitt-DNA dieser NHL die entsprechenden Translokationen nachgewiesen (Abbildung 8). Aus der daraus erzielten Sequenzinformation wurden Oligonukleotide entworfen, die in einer direkten PCR bruchpunktüberspannende Produkte ergaben, mit der nach Sequenzierung jeweils identische Translokationsbruchpunkte aus mikrodisssezierten HRS-Zellen und NHL-Zellen der entsprechenden Kombinationslymphome nachgewiesen wurden (Tabelle 3). Ein Datenbankabgleich der Sequenzen zeigte in allen drei Fällen N-Nukleotide an den Translokationsbruchpunkten und eine exakte Lokalisierung der Bruchpunkte an der Grenze der JH6-Regionen (Abbildung 8).

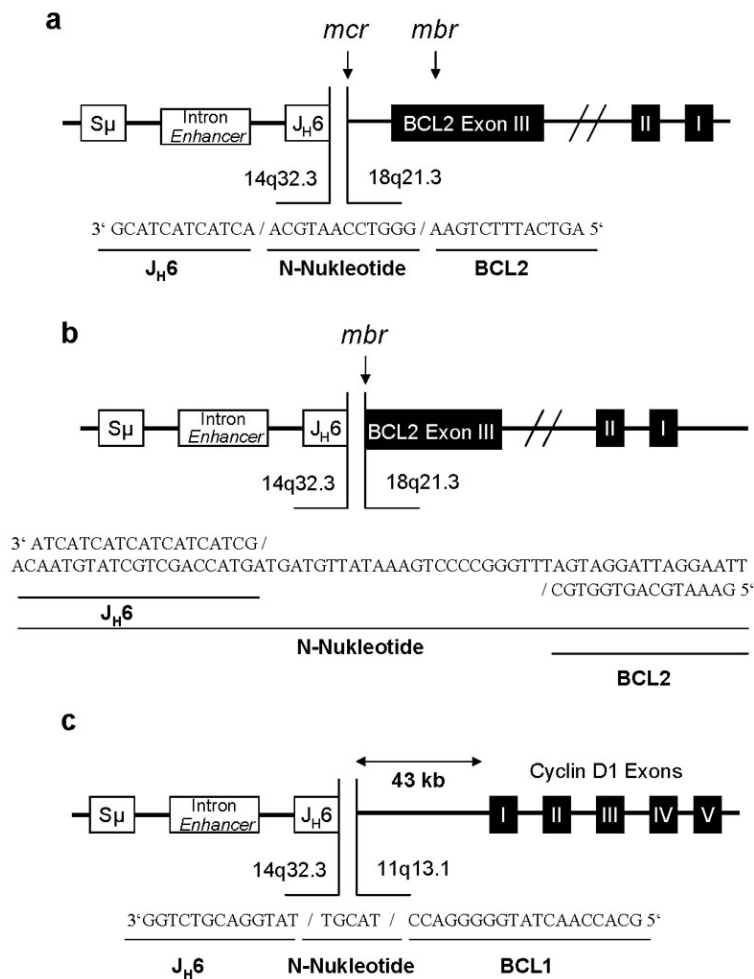


Abbildung 8: Identische Bruchpunkte in HRS-Zellen und NHL-Zellen der Ig-assoziierten BCL1 und BCL2-Translokationen. **a:** Bruchpunkt in HRS- und FL-Zellen des Falls 1 in der Nebenbruchpunkt-Region (*mcr*) des BCL2-Genlocus. **b:** Bruchpunkt in HRS- und FL-Zellen des Falls 2 in der Hauptbruchpunkt-Region (*mbr*) des BCL2-Genlocus. **c:** Bruchpunkt in HRS- und MCL-Zellen des Falls 5 43 kb des BCL1-Genlocus, außerhalb der häufig involvierten Region in Ig-assoziierten Translokationen. Alle Bruchpunkte befinden sich unmittelbar an der Grenze des Ig-JH-Gen-Locus. Ferner ließen sich an allen dieser Bruchpunkte N-Nukleotide nachweisen, die auch in (V)DJ-Umlagerungen zu finden sind. Die beiden letzten Befunde weisen auf eine Entstehung dieser Translokationen im Verlauf fehlerhafter DJ-Umlagerung in der frühen B-Zell-Entwicklung hin.

Auf Seiten des BCL2-Locus lagen die Translokationsbruchpunkte im Fall 1 in der *mcr*-Region und im Fall 2 in der *mbr*-Region. Im Fall 5 wurde ein Bruchpunkt in der BCL1-Region ca. 60 kb 3' des *mtc* nachgewiesen, was das Ausbleiben der zuvor gescheiterten bruchpunktüberspannenden Standard-PCR erklärt (Abbildung 8). Das Ausbleiben der PCR mit Oligonukleotiden in der *mbr* und *mcr* des BCL2-Locusses in den Kombinationslymphomen aus HL und FL erklärt sich vermutlich durch jeweils mehrere somatische Mutationen innerhalb der JH-Region an den Oligonukleotidbindungsstellen. Da sich in etwa 40% der DLBCL Ig-assoziierte Translokationen nachweisen lassen, wurde DLBCL-DNA des Falls 6 mittels S μ - und JH-LDI-PCR analysiert. Dies erbrachte jedoch kein Ergebnis. Eine Analyse mittels FISH, die den Ig-Locus flankieren, konnte aufgrund des schlechten Gewebezustandes nicht durchgeführt werden.

Tabelle 3: IgH-assoziierte Translokationen in Kombinationslymphomen zeigen identische Bruchpunkte in HRS- und NHL-Zellen

Fall	Lymphome	Translokation	Translokations-Bruchpunkt	Anzahl positiver Ansätze/ Anzahl analysierter Ansätze	Ausprägung des translozierten Allels
1	HL	IgH / BCL2	J _H 6 / mcr von BCL2	16/20	intermediär
	FL	IgH / BCL2	J _H 6/ mcr von BCL2	5/6	hoch
2	HL	IgH / BCL2	J _H 6/ mbr von BCL2	12/20	intermediär
	FL	IgH / BCL2	J _H 6/ mbr von BCL2	4/6	hoch
5	HL	IgH / BCL1	J _H 6/ ca. 43 kb 5' von Cyclin D1 ¹	13/22	keine
	MCL	IgH / BCL1	J _H 6/ 5' von cyclin D1	6/6	hoch

Die durch die JH-LDI-PCR ermittelten Ig-assoziierten BCL1- bzw. BCL2-Translokationen wurden in den HRS- und NHL-Zellen durch direkte PCR bestätigt. Für den Nachweis in einzelnen HRS-Zellen wurden jeweils 20-22 Einzelzellen analysiert, von denen jeweils 12-16 die identischen Sequenzen ergaben. Im Fall der NHL wurden je 6 Zellgruppen untersucht, von denen jeweils 4-6 die identischen Sequenzen ergaben.

¹ Translokationsbruchpunkt ca. 60 kb stromabwärts des Haupttranslokations-Clusters
mbr, Hauptbruchpunkt-Region; mcr, Nebenbruchpunkt-Region

In FL bzw. MCL werden BCL2 bzw. BCL1 aufgrund der transkriptionellen De-regulation dieser Gene durch regulatorische Elemente des Ig-Locus stark ausgeprägt. Im HL hingegen ist die Ig-Transkription als Konsequenz des Verlustes der B-Zellidentität drastisch reduziert. Um zu klären, ob in den Kombinations-lymphomen mit den beschriebenen Translokationen BCL2-Protein bzw. Cyclin D1 (codiert von BCL1) in den NHL und/oder den HL ausgeprägt werden, wurden von einer Kooperationsgruppe Gewebeschnitte der jeweiligen Lymphome immunhistochemisch untersucht. Erwartungsgemäß zeigten die NHL eine starke Ausprägung der entsprechenden Onkogene (Abbildung 9). Die Analyse von HRS-Zellen des Falls 5 zeigte keine Ausprägung von Cyclin D1. In HRS-Zellen der Fälle 1 und 2 ließen sich hingegen intermediäre Ausprägungen von BCL2 betrachten. Diese Ergebnisse stellen für das HL typische Befunde dar (Garcia et al. 2003; Bai et al. 2007). Vor dem Hintergrund stillgelegter Ig-Loci im HL wurde von einer Kooperationsgruppe geklärt, von welchem Allel die BCL2-Ausprägung in den HRS-Zellen des Falls 1 stammt. Zu diesem Zweck wurde ein SNP in der transkribierten Region des BCL2-Gens dieses Fall identifiziert, der heterozygot verteilt vorlag. Da dieser SNP mehr als 30 kb vom Translokationsbruchpunkt entfernt lag, wurde die Zuordnung der beiden Varianten des SNP zum translozierten und nicht-translozierten Allel indirekt mittels Sequenzierung von entsprechenden 2 Runden RT-PCR-Produkten des FL getroffen. Hierzu wurde aus ca. 300 mikrodisektierten FL-Zellen RNA gewonnen und die resultierende cDNA so verdünnt, dass die erste Runde der PCR mit Mengen-Äquivalenten ca. eines cDNA Moleküls gestartet wurde. Aus insgesamt 19 Reaktionen resultierten 16 Produkte, die direkt sequenziert wurden und alle jeweils ausschließlich die nicht-polymorphe Variante des BCL2-Gens enthielten. Da im FL BCL2-Transkripte des

translozierten Allels stark überrepräsentiert vorliegen, wurde die nicht polymorphe Variante dementsprechend dem translozierten Allel zugeordnet (Graninger et al. 1987). Zur Festlegung der transkriptionellen Aktivität der beiden BCL2-Allele in HRS-Zellen des entsprechenden Falls wurde die beschriebene Prozedur an ca. 300 laser-mikrodissektierte HRS-Zellen durchgeführt. Hierbei wurden aus insgesamt 24 Ansätzen 16 Produkte erzeugt, von denen 9 die nicht-polymorphe und 7 die polymorphe Variante enthielten. Wie bei der Sequenzierung der Transkripte aus FL-Zellen wurden in den Sequenz-Elektropherogrammen ausschließlich Einzelspitzen beobachtet, was die gleichzeitige Amplifikation beider Allele unwahrscheinlich macht. Diese Ergebnisse zeigen, dass in den NHL- und jeweils in den entsprechenden HRS-Zellen der untersuchten Kombinationslymphome identische Translokationsbruchpunkte vorliegen. In Fall 1 konnte des Weiteren gezeigt werden, dass in den HRS-Zellen beide BCL2-Allele in etwa gleichem Maße ausgeprägt werden, während in FL-Zellen dieses Falls BCL2-Ausprägung im überwiegenden Maße von einem, wahrscheinlich dem translozierten Allel stammt.

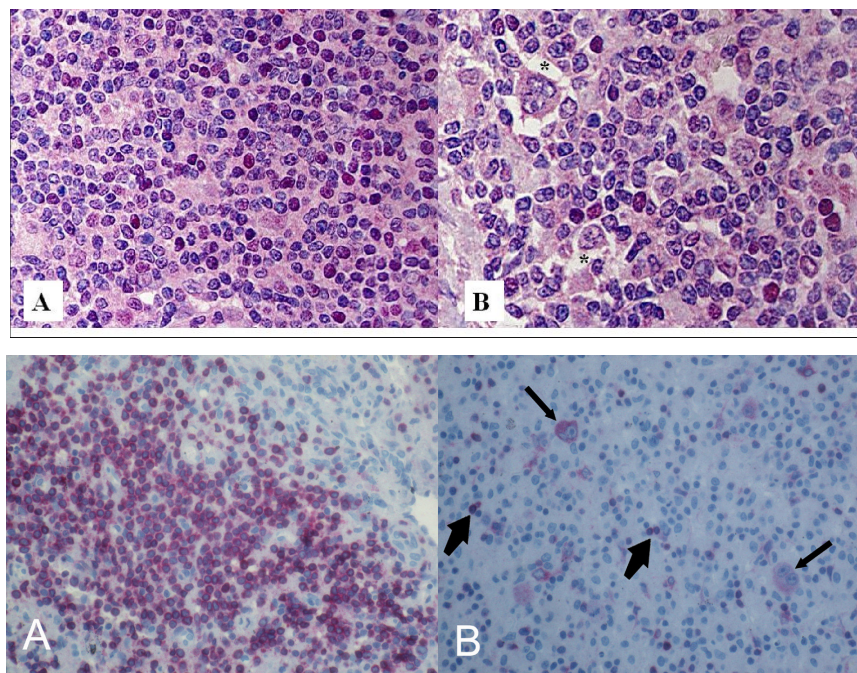


Abbildung 9: Ausprägung der translozierten Gene in HRS- und NHL-Zellen der Fälle 2 und 5. Unten: Immunohistochemische BCL2-Färbung des Gewebeschnitts von Fall 2. A: FL zeigt starke Ausprägung von BCL2, HRS-Zellen zeigen intermediäre Ausprägung von BCL2. Pfeile in B weisen auf einzelne HRS-Zellen. Oben: Die immunohistochemische Färbung zeigt starke Ausprägung von Cyclin D1 in MCL-Zellen (A) und keine Ausprägung in HRS-Zellen dieses Falls. HRS-Zellen sind mit Sternen gekennzeichnet. (Diese Untersuchungen wurden von Mitarbeitern des Instituts für Pathologie Frankfurt/M. durchgeführt).

3.2.2 Mutationsanalyse der Tumorsuppressorgene FAS und NFKBIA ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$) in HL und NHL der untersuchten Kombinationslymphome

In 10-20% aller cHL wurden inaktivierende Mutationen des NFKBIA-Gens (codierend für $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$) identifiziert. (Cabannes et al. 1999; Emmerich et al. 1999; Jungnickel et al. 2000). Außerdem finden sich in seltenen Fällen (9%) Mutationen im FAS-Gen. (Müschen et al. 2000a; Maggio et al. 2003). Letztere genetische Läsion lässt sich auch in einigen Fällen des DLBCL und FL beobachten (Gronbaek et al. 1998). Um die Bedeutung dieser transformierenden Ereignisse in der Pathogenese der untersuchten Kombinationslymphome zu klären, wurden mikrodyssektierte HRS-Einzelzellen und NHL-Zellgruppen dieser Fälle auf diese Gen-Mutationen untersucht. In Fall 3 wurde B-CLL-DNA aus B-Zellen des peripheren Bluts gewonnen, die in dieser Entität zu ca. 90% aus Tumorzellen bestehen. Die Sequenzanalyse nach 2 Runden PCR umfasste dabei für das NFKBIA-Gen alle 6 Exons, während sich die FAS-Sequenzanalyse auf die Exons 7-9 beschränkte, da hier der größte Teil aller Mutationen lokalisiert ist (Gronbaek et al. 1998). Es wurden insgesamt jeweils 5-11 HRS-Einzelzellen und 3-11 NHL-Zellgruppen analysiert, so dass von jedem Fall alle untersuchten Exons von mindestens 3 Zellen/Zellgruppen sequenziert wurden. In keinem der Experimente, die in die Sequenzanalyse eingegangen sind, führten die Negativ-Kontrollen zu einem Produkt. Wie die Sequenzanalyse zeigte, lagen in keinem der untersuchten Lymphome Mutationen in FAS oder NFKBIA vor.

Tabelle 4: Mutationsanalyse von FAS, NFKBIA und TP53 in Kombinationslymphomen

Fall	Lymphom	Mutationsanalyse FAS		Mutationsanalyse NFKBIA		Mutationsanalyse TP53	
		Anzahl positiver Ansätze / Anzahl Gesamt Ansätze	Mutationen	Anzahl positiver Ansätze / Anzahl Gesamt Ansätze	Mutationen	Anzahl positiver Ansätze / Anzahl Gesamt Ansätze	Mutationen
				Exons 1-2	Exons 3-6		
1	HL	4/6	keine	3/6	8/10	keine	n.a.
	FL	4/8	keine	4/6	5/6	keine	n.a.
2	HL	4/7	keine	6/9	8/10	keine	n.a.
	FL	7/9	keine	8/11	6/10	keine	n.a.
3	HL	2/5	keine	3/9	4/4	keine	5/7
	B-CLL	6/6	keine	3/4	4/4	keine	1/1 ⁵
4	HL	4/9	keine	4/9	9/11	keine	n.a.
	SMZL	3/4	keine	4/6	4/4	keine	n.a.
5	HL	4/6	keine	4/5	6/6	keine	12/13
	MCL	5/6	keine	3/9	6/9	keine	1/1 ⁵
	HL	3/5	keine	3/8	4/6	keine	7/10
6	DLBCL	3/3	keine	4/4	4/4	keine	6/6

Die Sequenzanalyse des FAS-Gens umfasste Exon 7-9, im Fall des NFKBIA-Gens wurden alle 6 codierenden Exons sequenziert. Für das TP53-Gen wurden die Exons 4-8 sequenziert. Je untersuchtem Exon und Lymphom wurden mindestens drei Sequenzen ausgewertet. Dies sollte sicherstellen, dass insbesondere bei den untersuchten Einzelzellen beide Allele sequenziert wurden. Dargestellt sind nur Zell-Proben bei denen alle Exons sequenziert wurden. Von HRS-Zellen des Falls 3 konnten aus Materialgründen nur zwei Sequenzen des Exons 8 des FAS-Gens ermittelt werden. Für die unersuchten Regionen des FAS- und des NFKBIA-Gens fanden sich in keinem der Fälle Mutationen. In Fall 6 wurden 2 Basenaustausch-Mutationen ausschließlich in DLBCL-Zellen ermittelt.

¹ Mutationen auf separaten Allelen, Positionen beziehen sich auf NCBI Eintrag NM_000546.4

n.a. nicht analysiert; K = T/G, Y = C/T

3.2.3 Mutationsanalyse des Tumorsuppressorgens TP53 in HL und NHL ausgewählter Kombinationslymphome

Das TP53-Gen, welches p53 codiert, ist eines der am häufigsten mutierten Gene in menschlichen Krebserkrankungen. So finden sich auch in MCL, B-CLL und DLBCL häufig Mutationen in TP53 (Gaidano et al. 1991; Greiner et al. 1996; Zoldan et al. 1996). Im HL sind TP53-Mutationen dagegen selten (Montesinos-Rongen et al. 1999; Küpper et al. 2001; Maggio et al. 2001; Feuerborn et al. 2006). Daher wurden die TP53-Gene der Kombinationslymphome der Fälle 3, 5 und 6 in Zusammenarbeit mit einer Kooperationsgruppe untersucht. Da Mutationen in TP53 überwiegend in den Exons 4-8 beschrieben wurden, beschränkte sich die Sequenzanalyse dabei auf diese Regionen (Krug et al. 2002). Da sich im Falle des MCL, DLBCL und der B-CLL im Gegensatz zum FL das Tumorgewebe bzw. (bei der B-CLL) B-Zellen des peripheren Bluts zum überwiegenden Teil aus Tumorzellen zusammensetzen, wurden die entsprechenden DNA-Abschnitte aus Ganzschnitt-DNA nach einer Runde PCR sequenziert. Jeweils 7-13 einzeln laser-mikrodissektierte HRS-Zellen der entsprechenden Fälle wurden nach zwei Runden untersucht (Tabelle 4). Die Auswertung dieser so ermittelten Sequenzen der Fälle 5 und 3 ergaben keine

Mutationen in den NHL oder HL. In Fall 6 ergaben die Sequenzen der DLBCL-Zellen zwei Aminosäure-Austausch-Mutationen, verteilt auf die Exons 7 und 8. Im Gegensatz dazu wiesen HRS-Zellen dieses Falls ausschließlich nicht-mutierte-Sequenzen des TP53-Gens auf. Die Aufklärung der Verteilung der ermittelten Mutationen auf die beiden Allele des DLBCL wurde durch eine Kooperationsgruppe mittels 2 Runden PCR aus laser-mikrodissektierten Einzelzellen des DLBCL durchgeführt. So wurden 30 DLBCL-Einzelzellen mikrodissektiert, die nach Proteinnase K-Behandlung verdünnt und jeweils auf 3 verschiedene Reaktionsansätze verteilt wurden. Von diesen Reaktionen wurden jeweils 18 Sequenzen der untersuchten DNA-Abschnitte erhalten. 11 dieser Ansätze erbrachten Sequenzen mit jeweils Einzelspitzen an den Positionen der Mutationen, was auf die Sequenzierung einzelner Allele schließen lässt. Von diesen 11 Zellen zeigten 6 eine Mutation in Exon 7, während Exon 8 in diesen Zellen unmutiert war. In den restlichen 5 dieser 11 Zellen ließ sich ein gespiegeltes Verteilungsmuster beobachten (Tabelle 5). Aus 6 Zellen wurden an beiden Stellen der Mutationen Doppelspitzen beobachtet, was auf die gleichzeitige Sequenzierung beider Allele zurückzuführen ist. Aus einer Zelle wurden ausschließlich die Keimbahnsequenzen an beiden Positionen nachgewiesen (Tabelle 5). Das so ermittelte Verteilungsmuster der beiden Mutationen deutet darauf hin, dass diese in den DLBCL-Zellen auf zwei Allelen verteilt liegen: In keinem der analysierten Zellen wurde ein einzeln nachgewiesenes mutiertes Allel (sichtbar als Einzelspitze) des Exons 7 gleichzeitig mit einem einzeln nachgewiesenen mutierten Allel des Exons 8 beobachtet, wie es im Falle einer Verteilung beider Mutationen auf einem Allel zu erwarten wäre. Der Nachweis der Keimbahnsequenzen an beiden Positionen in nur einer Zelle ist vermutlich auf eine fälschlich ausgewählte Nicht-Tumorzelle zurückzuführen.

Tabelle 5: Sequenzanalyse von TP53 einzelner DLBCL-Zellen des Falls 6

Sequenz Exon 7 ¹	Sequenz Exon 8 ¹	Anzahl der Sequenzen aus Einzelzellen (n=18)
G984T	C1071C	6
G984G	C1071T	5
G984K	C1071Y	6
G984G	C1071C	1

Das Verteilungsmuster der beiden Basenaustausch-Mutationen in Exon 7 bzw. Exon 8, das durch die Einzelzellanalyse ermittelt wurde, deutet auf eine Verteilung dieser Mutationen auf die beiden Allele des DLBCL-Tumorklons hin. Sequenzen mit Mutationen sind fett markiert, Sequenzen bei gleichzeitigem Nachweis der mutierten- und der Keimbahnsequenz fett und kursiv.

¹ Positionen beziehen sich auf NCBI Eintrag NM_000546.4

K = T/G, Y = C/T

3.3 Suche nach Tumorsuppressorgenen im HL und NHL

3.3.1 Mutationsanalyse des NFKBIA ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$)-Gens in *in vitro* aktivierten B-Zell ähnlichen DLBCL

Genomweite Genexpressionsstudien der letzten Jahren konnten mehrere Subtypen des DLBCL identifizieren, die sich in Hinsicht auf Genausprägung und klinischen Verlauf wesentlich unterscheiden (Alizadeh et al. 2000; Rosenwald et al. 2002; Monti et al. 2005). Der GC-B-Zell-ähnliche Subtyp zeigt dabei eine Genausprägungs-Signatur, die GC-B-Zellen ähnelt, während der ABC-ähnliche Subtyp in seinem Genausprägungsmuster stark an *in vitro* aktivierte B-Zellen erinnert. Auffällig bei der letzten Gruppe von DLBCL, die eine schlechtere klinische Prognose hat, ist die starke Ausprägung von zahlreichen Genen, die durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert werden.

In einer DLBCL-Zelllinie konnten in der Vergangenheit NFKBIA-Mutationen identifiziert werden, wie sie auch im HL vorkommen und an der konstitutiven NF- κ B-Aktivität in diesem Lymphom mitwirken (Hinz et al. 2002; Kalaitzidis et al. 2002). Um die pathogenetische Ursache für die konstitutionelle NF- κ B-Aktivität im ABC-DLBCL zu erforschen, wurden primäre DLBCL-Biopsate auf NFKBIA-Mutationen untersucht. Zur Unterscheidung der DLBCL-Sub-Typen wurden bislang zahlreiche immunhistochemische Klassifikatoren entwickelt, die die globale Genexpressionsanalyse ersetzen sollen (Colomo et al. 2003; Hans et al. 2004; Muris et al. 2006; Amen et al. 2007; Sjö et al. 2007). Dies basiert im Wesentlichen auf dem immunhistochemischen Nachweis charakteristischer Proteine für entweder GC-B-Zellen oder *in vitro* aktivierte B-Zellen. Demzufolge wurden von einer Kooperationsgruppe Paraffinschnitte von 38 DLBCL-Fällen auf Ausprägung und Lokalisation der Proteine Mum1, CD10, BCL6 und CD138 untersucht (Abbildung 10). Mum1-Ausprägung, die in späten oder Post-GC-B-Zellen zu beobachten ist, zeigte sich in Genausprägungsstudien als charakteristischer Marker für den ABC-DLBCL-Subtyp (Alizadeh et al. 2000; Falini et al. 2000; Rosenwald et al. 2002). Demgegenüber ist die kombinierte Ausprägung von BCL6 und CD10 ein Charakteristikum für GC-B-Zellen und entsprechend auch für GC-B-Zell-ähnliche-DLBCL (Alizadeh et al. 2000; Rosenwald et al. 2002; Klein et al. 2003). CD138 wurde verwendet, um plasmablastische Varianten des DLBCL auszuschließen (Colomo et al. 2003). Die untersuchten DLBCL wurden dabei als positiv klassifiziert, wenn mehr als 25% aller Tumorzellen positiv waren. Für die

Tanskriptionsfaktoren MUM1 und BCL6 wurden des Weiteren nur nukleäre Färbungen als positiv eingestuft.

Demzufolge wurden DLBCL als ABC-ähnlich klassifiziert, wenn eine Marker-Konstellation MUM1+/CD10-/BCL6-/CD138- vorlag. 15 der 33 analysierten Lymphome zeigten diesen Immunphänotyp. Im Gegensatz dazu wurden 7 DLBCL anhand der Konstellation MUM1-/CD10+/BCL6+/CD138- als GC-B-Zell-ähnliche DLBCL eingestuft. Weitere 7 der analysierten Lymphome zeigten eine Ausprägung MUM1+/CD10-/BCL6+/CD138-, was einen GC- oder Post-GC-Ursprung nahe legt, vor dem Hintergrund, dass späte GC-B-Zellen MUM1 Ausprägung zeigen, was nicht zwangsläufig BCL6-Ausprägung ausschließt. 4 der DLBCL waren MUM1-negativ, zeigten aber entweder keine Ausprägung von BCL6 oder CD10 und wurden daher als unklassifizierbar eingestuft. Keiner der untersuchten Fälle zeigte eine positive Färbung für CD138.

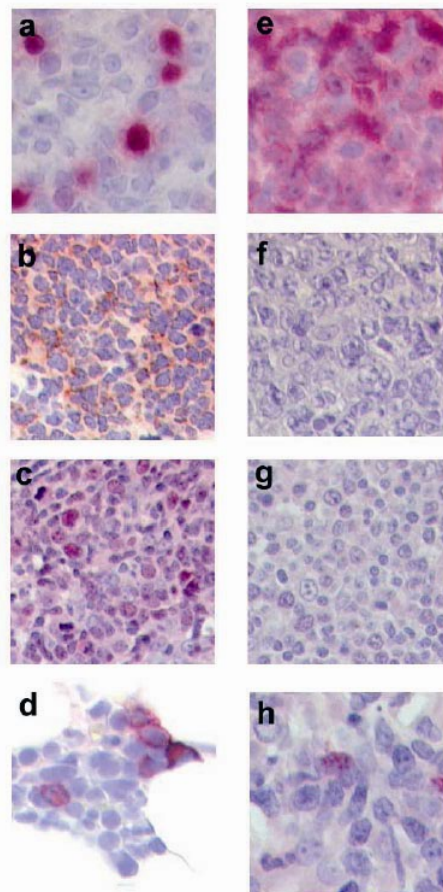


Abbildung 10: Immunhistophänotypische Untersuchung von ABC-DLBCL

a-c Tonsille, d Knochenmark Präparate, e-h ABC-DLBCL.

a, e MUM1, b, f CD10, c, g BCL6, d, h CD138.

Wie erwartet, zeigten wenige Zellen im Keimzentrum nukleäre Ausprägung von MUM1 (a), während die Mehrzahl der ABC-DLBCL starke nukleäre Ausprägung aufwies (e). GC-B-Zellen zeigten erwartungsgemäß starke Oberflächen- und zytoplasmatische Ausprägung von CD10 (b) und nukleäre Ausprägung von BCL6 (c). ABC-DLBCL fehlt die Ausprägung von sowohl CD10 als auch BCL6 (f, g). Einige Plasmazellen in Knochenmark-Präparaten prägen CD138 aus (d). ABC-DLBCL fehlt dieser Oberflächen-Marker (h). Vergrößerung x 200, angefertigt von Mitarbeitern des Instituts für Pathologie der Universität Köln.

Tabelle 6: Immunhistophänotypischer Klassifikator zur Unterscheidung der DLBCL-Subgruppen

Marker-Konstellation	Vermutlicher Subtyp	DLBCL (N=33)
MUM1-/CD10+/BCL6+/CD138-	GC-B-Zell-ähnlich	7
MUM1+/CD10-/BCL6+/CD138-	Post-GC-B-Zell-ähnlich / nicht-ABC-DLBCL	7
MUM1+/CD10-/BCL6-/CD138-	ABC-DLBCL-ähnlich	15
MUM1-/CD10-/BCL6+/CD138- oder MUM1-/CD10-/BCL6+/CD138-	Vermutlich GC-B-Zell-ähnlich / unklassifizierbar	4

Von 16 der 33 untersuchten DLBCL lagen zusätzlich Gefrier-Biopsate vor, aus denen genomische DNA gewonnen wurde, die auf Mutationen in allen 6 Exons des NFKBIA-Gens untersucht wurde. Im ersten Teil der Mutationsanalyse wurde der Genlocus, auf dem sich die codierende Sequenz von NFKBIA erstreckt, auf größere Insertionen oder Deletionen untersucht. So wurde eine PCR durchgeführt, die den größten Teil der genomischen Region, die für die mRNA des NFKBIA-Gens codiert, erfasste. Alle untersuchten Proben zeigten bei der Auswertung durch Agarose-Gelelektrophorese Produkte identischer Länge. Zusätzliche, verkürzte oder verlängerte Produkte wurden nicht beobachtet. Der zweite Teil der Mutationsanalyse bestand aus der Sequenzanalyse, ermittelt aus sequenzierten PCR-Produkten, die alle sechs Exons des NFKBIA-Gens beinhalteten (Tabelle 6). Auffällig war hierbei, dass in 15 der 16 analysierten Fälle bis dahin unbekannte oder bereits beschriebene SNP entdeckt wurden. In der Mehrzahl der Fälle waren gleichzeitig jeweils beide Varianten der SNP nachweisbar, was durch Doppelspitzen in den Sequenz-Elektropherogrammen ersichtlich wurde. Die so erfassten bekannten SNP in der codierenden Sequenz an den Positionen 175 und 400 sind stille Varianten, haben also keine Auswirkung auf die Aminosäuresequenz von I κ B α . Die bis dahin bekannten Polymorphismen an den Positionen 1050 und 1174 in der 3' UTR und Intron 4 (in Fall 5) des NFKBIA-Gens sind nicht codierend.

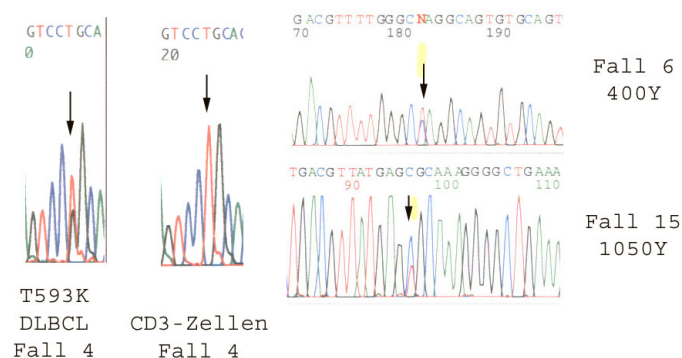


Abbildung 11: Sequenz-Elektropherogramme der untersuchten NFKBIA-Regionen aus DLBCL und Nicht-DLBCL-Zellen. Rechts: Die übereinander abgebildeten Sequenz-Elektropherogramme zeigen durch Auftreten von Doppelspitzen (markiert durch Pfeile) heterozygot verteilte SNP in Fall 6 und 15. Links: Dargestellt ist eine monoallelische Basenaustausch-Mutation (angezeigt durch eine Doppelspitze an der markierten Stelle) in DLBCL-Zellen und Abwesenheit dieser Mutation in aus peripherem Blut gewonnenen CD3-T-Zellen des Fall 4.

Zusätzlich zu den bis dahin bekannten Sequenzvarianten wurde in vier der DLBCL-Fälle jeweils eine unbekannte monoallelische Sequenzvariante entdeckt (Tabelle 7). Zwei dieser Unterschiede zu der bis dahin veröffentlichten Sequenz von NFKBIA waren identisch und lagen in der 5'UTR 8 bp hinter dem Transkriptionsstart. Die beiden anderen Varianten lagen in der codierenden Sequenz und haben übertragen auf das I κ B α -Protein Aminosäure-Austausche zur Folge. In Fall 10 ist dies ein Austausch von Prolin nach Serin, während die ermittelte Abweichung zur Keimbahnsequenz in Fall 4 einen Austausch von Cystein nach Glycin zur Folge hat.

Tabelle 7: Mutationsanalyse von NFKBIA (I κ B α) und immunphänotypische Klassifizierung von DLBCL

Fall	Ermittelte Sequenzvarianten ¹		Marker Ausprägung		
	Polymorphismen ²	Mutation	Mum1/IRF4	CD10	BCL6
1	400Y, 1050Y, 1174R	T593K⁴	+	-	-
2	400Y		+	-	-
3	C175Y, 1050Y, 1174R		+	-	-
4			+	-	-
5	Y ³		+	-	-
6	C175Y, 400Y, 1050Y, 1174R		+	-	-
7	Dupl. 8-15⁵		+	-	-
8	C175T, 1050Y, 1174R		+	-	-
9	400Y		+	-	-
10	C175Y, C287Y⁶ , 1050Y, 1174R		+	-	-
11	Dupl. 8-15⁵ , 400Y		+	-	+
12	C175Y, 1050Y, 1174R		+	-	+
13	C175Y, 400Y, 1050Y, 1174R		-	+	+
14	C175T, 1050Y, 1174R		-	+	+
15	400Y, 1050Y, 1174R		-	+	-
16	1050T, 1174A, dupl. 1190-1191		-	-	+

Die Sequenzanalyse aller codierenden Exons des NFKBIA-Gens erbrachte somatische heterozygote Mutationen in einem der untersuchten Fälle (Fall 4). Auffällig bei der Analyse war das Auftreten zahlreicher SNP, die in der Mehrzahl der Fälle heterozygot verteilt auftraten. Dies ließ darauf schließen, dass beide Allele in diesen Fällen anwesend waren. Fälle 1-10 fallen in ABC-DLBCL-Subtyp-Klassifikation; bislang unbeschriebene Sequenzvarianten sind fett markiert.

¹Zahlen beziehen sich auf den NCBI-Eintrag NM_020529.

²selteneres Allel der polymorphen Varianten ist nur bei SNP an Position 175 statistisch ermittelbar

³SNP lokalisiert im Intron 3 gemäß NCBI-Eintrag AL133163:3 an Position 102543

⁴Pro->Ser Austausch an Position 65 der I κ B α Aminosäure Sequenz (NP_065390)

⁵monoallelische Duplikation (8 bp)

⁶Cys->Gly Austausch an Position 167 der I κ B α Aminosäure Sequenz (NP_065390)

Y = C/T, R = A/G, K = T/G.

Um den somatischen Ursprung dieser Sequenz-Varianten zu untersuchen, wurden die entsprechenden DNA-Abschnitte aus Nicht-Tumor-Gewebe der entsprechenden Patienten sequenziert. Hierzu wurde DNA in Zusammenarbeit mit einer Kooperationsgruppe aus CD3+T-Zellen oder Granulozyten isoliert, die aus Blutproben der Patienten mittels Magnetischer Zellsortierung (MACS) bzw. Dichtezentrifugation gewonnen wurden. Da einer der Patienten verstorben war (Fall 10), wurde DNA aus laser-mikrodissektierten Nicht-Tumorzellen des vorliegenden Biopsats gewonnen. In drei dieser Fälle zeigten sich die zuvor in der Tumor-DNA beobachteten Sequenz-Varianten auch in den Nicht-Tumorzellen, während eine der ermittelten Abwei-

chungen von der publizierten Sequenz somatischen Ursprungs war. Die monoallelische 8 bp-Duplikation (Fälle 7 und 11) scheint aufgrund des Vorhandenseins in den Nicht-Tumorzellen und des Auftretens dieser identischen Variante in zwei unabhängigen Patienten mit großer Wahrscheinlichkeit ein bislang unbeschriebener SNP zu sein. Ob es sich bei der Abweichung von der publizierten Sequenz des Falls 10 um einen Polymorphismus oder eine Keimbahn-Mutation bei dem Patienten handelt, kann nicht eindeutig geklärt werden. Eine somatische, monoallelische Mutation ließ sich demnach nur in einem DLBCL ermitteln (Tabelle 7). Um zu überprüfen, ob das mutierte und das unmutierte Allel in diesem Fall in etwa gleichem Maße ausgeprägt wurden, wurde aus dem Gefrier-Biopsat RNA isoliert und der entsprechende Abschnitt sequenziert. Die Sequenzierung des resultierenden Produkts ergab eine Doppelspitze etwa der gleichen Höhe an der Stelle, an der zuvor auf genomischer DNA die Mutation ermittelt wurde. Hieraus lässt sich zwar das Mengenverhältnis der Ausprägung beider Allele nicht exakt quantifizieren, jedoch scheint keines der beiden Allele von NFKBIA in diesem Fall stillgelegt zu sein, wie dies etwa durch epigenetische Mechanismen denkbar wäre.

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass NFKBIA-Mutationen in der Pathogenese des ABC-ähnlichen-DLBCL keine dominante Rolle spielt.

3.3.2 Mutationsanalyse des BAD-Gens in HL und NHL

In NHL sind zahlreiche genetische Läsionen in Genen der BCL2-Familie bekannt, die durch Deregulation anti-apoptotischer Faktoren oder Inaktivierung pro-apoptotischer Faktoren zur Pathogenese dieser Lymphome beitragen: Beispiele hierfür sind die Ig-assoziierte Translokation des BCL2-Locus in nahezu allen Fällen des FL und etwa der Hälfte aller DLBCL, sowie Mutationen des BAX-Gens im Multiplen Myelom und BL und Mutationen des BIK-Gens in FL-, DLBCL- und MALT-Lymphomen (Meijerink et al. 1998; Gutierrez et al. 1999; Arena et al. 2003; Küppers 2005). Durch chromosomale Verluste regulatorischer microRNA, miR15 und miR16, in der chromosomalen Bande 13q14 ist in B-CLL darüber hinaus die Regulation des BCL2-Gens gestört (Cimmino et al. 2005).

Mäuse, die defizient für das proapoptotische BCL2-Familien-Mitglied BAD sind, entwickeln spontan B-Zell-Lymphome (Ranger et al. 2003). Diese Lymphome scheinen sich von GC-B-Zellen abzuleiten, wie durch klassengewechselte Ig-Gene und starke BCL6-Ausprägung in diesen Lymphomen gezeigt wurde.

Aufgrund der Hinweise auf eine pathogenetische Bedeutung des BCL2-vermittelten Signalwegs in B-Zelllymphomen und direkter funktioneller Anzeichen für eine Tumorsuppressor-Rolle von BAD aus Maus-Studien wurde die Rolle von BAD-Genmutationen in der humanen Lymphom-Pathogenese untersucht. Hierzu wurden sowohl Frischgewebe verschiedener B-NHL als auch Zelllinien von NHL und HL verschiedener Pathologischer Zentren gesammelt. Die Auswahl der verschiedenen Fälle entsprach dabei einem repräsentativen Querschnitt aller häufigen B-Zell-Lymphome. Dies waren primäre Biopsien der DLBCL-, FL-, B-CLL-, MCL- und MALT-Lymphome und ferner Zelllinien von BL, MM, HL und DLBCL. Die heterogene Gruppe der DLBCL wurde weiter unterteilt gemäß des immunphänotypischen Klassifikators, der bereits in 3.3.1 angewendet wurde. Bei der B-CLL werden entsprechend somatisch mutierter und unmutierter Ig-V-Gene zwei Gruppen unterschieden. Um eine charakteristische Auswahl dieser zu gewährleisten, wurden 8 der 16 B-CLL zuvor auf deren Ig-V-Gen-Mutationsstatus untersucht. In 4 dieser 8 Fälle konnten dabei durch Sequenzierung mutierte Ig-V-Gene nachgewiesen werden, wohingegen die restlichen 4 B-CLL unmutierte Ig-V-Gene aufwiesen.

Tabelle 8: Abwesenheit von Mutationen im BAD-Gen in B-Zell Lymphomen

Lymphom	Untersuchtes Material	Anzahl der untersuchten Proben	Mutationen
MCL	Biopsate	11	keine
B-CLL	PBMC ¹	16	keine
FL	Biopsate ²	10	keine
MALT Lymphome	Biopsate	7	keine
DLBCL	Biopsate ³	15	keine
	Zelllinien ⁴	4	keine
BL	Zelllinien ⁵	8	keine
MM	Zelllinien ⁶	3	keine
HL	Zelllinien ⁷	7	keine

Die Sequenzanalyse des BAD-Gens umfasste alle codierenden Exons dieses Gens in einer repräsentativen Auswahl der am häufigsten auftretenden B-Zell-Lymphome. Die Abwesenheit von Mutationen deutet auf eine fehlende Rolle dieser Mutationen in der Pathogenese von menschlichen Lymphomen hin.

¹ 4 B-CLL enthielten mutierte IgV-Gene, 4 enthielten unmutierte IgV-Gene, 8 dieser Fälle wurden nicht auf somatische Hypermutation untersucht.

² Lymphomzellen wurden laser-mikrodissektiert.

³ Fälle wurden zuvor subklassifiziert in 8 ABC-DLBCL and 7 nicht-ABC-DLBCL.

⁴ BJAB, RC-K8, OCI-Ly3, OCI-Ly10

⁵ BL-41, BL-21, BL-60, Raji, BL30, Namalwa, Ramos

⁶ U-266, OMP-2, RPMI-8226

⁷ L-591, L-1236, L-428, L-540, KM-H2, HDLM-2, Dev. Zwei dieser HL Zelllinien (HDLM2, L540) stammen von T-Zellen ab.

Aus den akquirierten Zelllinien und dem Lymphom-Gewebe wurde in Zusammenarbeit mit einer Kooperationsgruppe genomische DNA isoliert und nach einer Runde PCR alle codierenden Exons des BAD-Gens sequenziert. Im Fall der DLBCL, MCL und MALT-Lymphome geschah dies aus 10 µm Gefrier-Gewebe-schnitten. B-CLL-DNA wurde aus B-Zellen des peripheren Bluts der Patienten und FL-DNA wurde nach Laser-Mikrodissektion von Tumorzellen gewonnen. Die so ermittelten Se-

quenzen ergaben, dass keine der untersuchten Lymphome Mutationen bzw. bislang unbekannte Sequenzvarianten aufwiesen (Tabelle 8).

3.3.3 Mutationsanalyse der Gene CASP10, CASP8 und FADD in HRS-Zellen

Der Apoptose-Rezeptor FAS spielt eine entscheidende Rolle im extrinsischen Apoptose-Signalweg von Lymphozyten. Nach Stimulation durch den FAS-Liganden oder durch antagonistische Antikörper kommt es am cytoplasmatischen Teil dieses Rezeptors zur Bildung des apoptose-induzierenden Komplexes (DISC). Dieser besteht neben dem FAS-Rezeptor selbst aus dem Adapter Molekül FADD und den Cystein-Proteasen Procaspase 8 und Procaspase 10. Nach Stimulation kommt es durch proteolytische Spaltung von Procaspase 8 und in deren Folge zur Initiation einer Signalkaskade, die in der Apoptose der Zellen mündet (Li-Weber und Krammer 2003).

Primäre HRS-Zellen und HL-Zelllinien prägen den FAS-Rezeptor aus, jedoch sind HL-Zelllinien resistent gegenüber FAS-vermittelter Apoptose (Re et al. 2000). Eine mögliche Erklärung hierfür könnten somatische Mutationen im FAS-Gen sein, welche in ca. 10% der untersuchten HL identifiziert werden konnten (Müschen et al. 2000a; Maggio et al. 2003).

Um eine Beteiligung von Mutationen in anderen Mitgliedern des FAS-vermittelten Apoptose-Signalweges an der Pathogenese des HL näher zu beleuchten, wurden in Zusammenarbeit mit einer Kooperationsgruppe HRS-Zellen auf somatische Mutationen in Genen untersucht, die für Mitglieder des DISC codieren. Dies waren die Gene CASP8, CASP10 und FADD. Hierzu wurden aus Zelllinien und primären laser-mikrodissektierten HRS-Zellen die Exons 11, 12 und 13 des CASP8 Gens, die Exons 1 und 2 des FADD-Gens und Exon 9 des CASP10-Gens sequenziert. Die Auswahl der sequenzierten Exons ergab sich dabei unter folgenden Voraussetzungen: Für das CASP10-Gen wurde ausschließlich das Exon 9 sequenziert, da in diesem Exon zuvor beschriebene Mutationen in NHL gehäuft identifiziert wurden (Shin et al. 2002). Außerdem wird von Exon 9 nahezu die gesamte Protease-Domäne des Proteins codiert. Analog dazu wurden für das CASP8-Gen die Exons 11,12 und 13 sequenziert, da diese die Protease-Domäne der Caspase-8 codieren. Im Fall des FADD-Gens wurden beide codierenden Exons sequenziert.

So wurde zunächst von den HL-Zelllinien L-1236, L-428, KM-H2 und L-591 genomische DNA gewonnen und die beschriebenen DNA-Abschnitte nach einer Runde PCR sequenziert. Diese Sequenzen ergaben keine Mutationen in den untersuchten Bereichen der analysierten Gene (Tabelle 9). Jedoch konnten in den Sequenzen der CASP8- und CASP10-Gene in den vier Zelllinien heterozygot verteilte Polymorphismen beobachtet werden, was durch Doppelspitzen in den Elektropherogrammen ersichtlich wurde. Dies lässt auf die Anwesenheit beider Allele dieser Gene in diesen Fällen schließen. In den Sequenzen des FADD-Gens wurden solche heterozygot verteilten Polymorphismen in der KM-H2 und L-591 ermittelt.

In der Folge wurden HRS-Zellen von 5 EBV-negativen HL und 5 EBV-positiven HL einzeln laser-mikrodissektiert und die entsprechenden DNA-Abschnitte nach 2 Runden PCR sequenziert. Um zu verhindern, dass aus den Einzel-Zell-Ansätzen nur ein Allel der Zelle sequenziert wurde, wurden je Gen und Produkt mindestens 3 Einzel-Zell-Ansätze sequenziert.

Diese Sequenzen zeigten, dass in keiner der untersuchten HRS-Zellen Mutationen zu finden waren. Jedoch ließen sich in den Sequenzen zahlreiche heterozygot verteilte SNP erkennen. Dies war für das CASP8-Gen in 8 von 10 der HL, für das CASP10-Gen in 2 von 10 HL und für das FADD-Gen in 7 von 10 HL der Fall. Diese Beobachtungen bedeuten für die beiden Gene CASP8 und FADD, dass in der Mehrzahl der Fälle der Verlust eines Allels im HRS-Klon ausgeschlossen werden kann. Im Fall des CASP10-Gens lässt sich diese Feststellung für zwei der Fälle treffen.

Tabelle 9: Fehlen von Mutationen in den Genen CASP8, CASP10, FADD, deren Genprodukte für Mitglieder des DISC codieren

Zelllinie/ Fall	Subtyp	EBV	Sequenzen ^a	CASP8 Exons 8-10 ^c		CASP10 Exon 9 ^c		FADD Exons 1, 2 ^c	
				SNP	Mutationen	SNP	Mutationen	SNP	Mutationen
L1236	MC	-	n/a	+ ^c	keine	+ ^{g, h}	keine	-	keine
L428	NS	-	n/a	+ ^c	keine	+ ^{e, g}	keine	-	keine
KM-H2	MC	-	n/a	+ ^c	keine	+ ^h	keine	+ ^j	keine
L591	NS	+	n/a	+ ^{b, c}	keine	+ ^h	keine	+ ^j	keine
1	NS	-	28	+ ^{b, d}	keine	-	keine	+ ^j	keine
2	NS	-	22	-	keine	+ ^f	keine	-	keine
3	NS	-	30	+ ^{b, c}	keine	-	keine	+ ^j	keine
4	MC	+	27	+ ^{b, d}	keine	-	keine	+ ^{j, i}	keine
5	NS	-	42	+ ^b	keine	-	keine	+ ^j	keine
6	MC	+	25	+ ^d	keine	-	keine	+ ^j	keine
7	NS	-	22	+ ^b	keine	-	keine	+ ^j	keine
8	MC	+	30	+ ^b	keine	-	keine	+ ^j	keine
9	MC	+	22	+ ^c	keine	+ ^e	keine	-	keine
10	MC	+	16	-	keine	-	keine	-	keine

Die Sequenzanalyse des CASP8-Gens umfasste die für die Protease-Domäne codierende Sequenz der Exons 8-10, im Falle des CASP10-Gens umfasste die sequenzierte Region das ebenfalls die Protease-Domäne codierende Exon 9. Im Falle des FADD-Gens wurden beide codierenden Exons sequenziert. Dies wurde an 4 HL-Zelllinien und an Einzelzellen von 10 primären HL durchgeführt. Je Exon und Fall wurden 3-6 Sequenzen ausgewertet; es wurden keine Mutationen beobachtet. Die Anwesenheit heterozygot verteilter SNP in der Mehrzahl der Fälle und untersuchten Gene belegt die Anwesenheit zweier Allele in diesen Fällen.

^a Gesamtzahl der Sequenzen von primären HRS-Zellen

^b heterozygoter SNP: rs3769818

^c heterozygoter SNP: rs1045485

^d heterozygoter SNP: rs1045487

^e heterozygoter SNP A>G an Position 1521 (Wang et al. 2001)

^f heterozygoter SNP: rs13010627

^g heterozygoter SNP: rs3900115

^h heterozygoter SNP: rs13006529

ⁱ heterozygoter SNP: rs2230821

^j heterozygoter SNP: rs1131677

3.3.4 Identifikation des TNFAIP3 (A20)-Gens als Tumorsuppressorgen im HL und PMBL

3.3.4.1 Genetische Hinweise auf eine Tumorsuppressorgen-Rolle für TNFAIP3 im HL und PMBL

Konstitutive NF-κB-Aktivität spielt eine zentrale Rolle für das Überleben von HRS-Zellen (Bargou et al. 1997; Hinz et al. 2001; Izban et al. 2001). Eine zum Teil direkte kausale Erklärung hierfür lieferten Befunde, dass sich in HRS-Zellen genetische

Veränderungen des HRS-Zellgenoms wie Amplifikation des chromosomalen Bereichs des REL-Gen-Locus oder inaktivierende Mutationen der Inhibitoren des NF- κ B-Komplexes finden lassen (Cabannes et al. 1999; Emmerich et al. 1999; Joos et al. 2002; Martin-Subero et al. 2002; Emmerich et al. 2003).

An der Regulation des NF- κ B-Signalweges, der durch verschiedene Stimuli aktiviert werden kann, sind zahlreiche Faktoren beteiligt (Hayden und Ghosh 2008). A20, das vom TNFAIP3-Gen codiert wird, ist ein Ubiquitin-modifizierendes Enzym, das TNF- und Toll-ähnliche Rezeptor-vermittelte NF- κ B-Aktivierung inhibiert (Boone et al. 2004; Wertz et al. 2004). Dieses Protein besteht aus einer N-terminalen Eierstock-Tumor-Domäne (OTU) und 7 C-terminal gelegenen A20-Zink-Fingern (Abbildung 11). Der molekulare Mechanismus der NF- κ B-Inhibition durch A20 wurde vor Kurzem aufgeklärt (Ea et al. 2006; Wu et al. 2006). So konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des IKK-Komplexes infolge von TNF-Rezeptor-Stimulation die Poly-ubiquitinierung des Rezeptor-interagierenden Faktors RIP1 an Lysin 63-Resten (K63) dieses Proteins erfordert (Ea et al. 2006; Wu et al. 2006). Die regulatorische Untereinheit des IKK-Komplexes, die Kinase IKK- γ (NEMO), bindet spezifisch diese Proteinmodifikation des RIP1-Proteins und aktiviert infolgedessen den IKK-Komplex. A20 entfernt diese K63-Polyubiquitinketten von RIP1 und fügt Polyubiquitin-Ketten an Lysin 48-Reste (K48) des RIP1-Proteins, was zur Degradierung dieses Faktors durch das Proteasom führt (Wertz et al. 2004).

Um zu überprüfen, ob eine mögliche Inaktivierung von A20 in der konstitutiven NF- κ B-Aktivierung in HRS-Zellen und damit auch in der Pathogenese dieses Lymphoms eine Rolle spielt, wurde A20 genetisch und funktionell in HRS-Zellen untersucht. Da auch Subgruppen des DLBCL, wie das ABC-ähnliche DLBCL und das PMBL, konstitutive NF- κ B-Aktivität aufweisen, wurden auch diese Lymphome untersucht.

TNFAIP3 ist ein direktes Zielgen transkriptioneller NF- κ B-Aktivität. So wie beim NF- κ B-Inhibitor I κ B α auch, erzeugt dies eine negative Rückkopplungs-Schleife, die auf diesem Weg die notwendige stringente Kontrolle der NF- κ B-Aktivität in Zellen ermöglicht (Sen 2006). Erwartungsgemäß lassen sich in HRS-Zellen durch *in-situ*-Hybridisierung Transkripte des TNFAIP3-Gens in primären HRS-Zellen und HL-Zelllinien nachweisen (Durkop et al. 2003). Untersuchungen zur Proteinausprägung von A20 wurden jedoch bislang nicht beschrieben. Aus diesem Grund wurden 6 HL-Zelllinien und eine PMBL-Zelllinie mittels *Western-Blot* auf A20-Protein-Expression

untersucht (Abbildung 11). Unter den HL-Zelllinien waren dabei eine Linie, die von L&H-Zellen des NLP HL abstammt (DEV), eine EBV-positive Zelllinie (L-591) und 4 EBV-negative Zelllinien (L-1236, KM-H2, L-428, HDLM-2). Wie auch das PMBL zeigen diese Subgruppen des HL konstitutive NF- κ B-Aktivität.

In drei der untersuchten Zelllinien konnte das etwa auf der Höhe von 80 kDa laufende A20-Protein nachgewiesen werden. Zusätzliche, verkürzte Proteinbanden waren dabei nicht erkennbar. Von diesen drei Zelllinien zeigte die L-428 sehr starke A20-Ausprägung. Im Gegensatz dazu ließ sich das A20-Protein in der PMBL-Zelllinie und in drei der HL-Zelllinien nicht nachweisen (Abbildung 11).

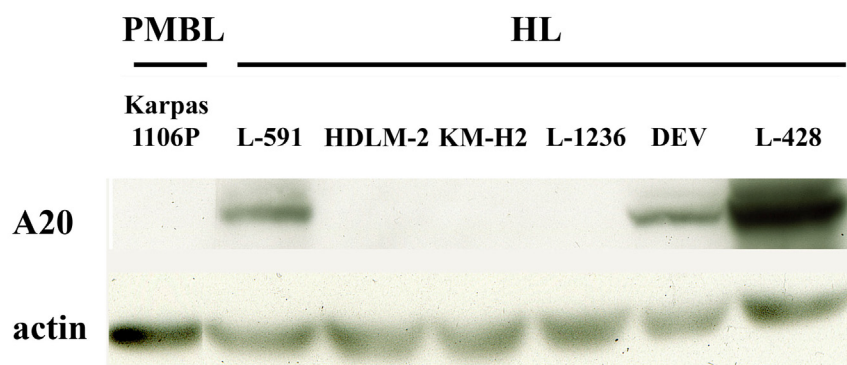


Abbildung 11: A20-Protein ist in 3 HL und einer PMBL-Zelllinie nicht nachweisbar. Von den untersuchten HL- und PMBL-Zelllinien wurden Protein-Lysate gewonnen. Hiervon wurden jeweils 100 μ g mittels Immunoblotanalyse auf A20-Protein-Ausprägung untersucht. In 3 der HL-Zelllinien und der PMBL-Zelllinie ließ sich so kein A20-Protein nachweisen, obwohl die Lagekontrolle β -Actin starke Signale zeigte.

Um den Grund für die fehlende Nachweisbarkeit des A20-Proteins zu untersuchen, wurde die gesamte codierende Region des TNFAIP3-Gens aller analysierten Zelllinien von RT-PCR-Produkten sequenziert. Diese Sequenzen ergaben für die Linien, bei denen A20-Protein-Ausprägung erkennbar war, keine Unterschiede der TNFAIP3-Gen-Sequenz im Vergleich zur publizierten Sequenz. Im Gegensatz dazu ließen sich in den A20-Protein-negativen Linien Mutationen erkennen, die die fehlende Nachweisbarkeit des A20-Proteins erklären können (Tabelle 10+11): In der PMBL-Linie Karpas-1106P wurde ein Verlust von 5 Basenpaaren in Exon 6 beobachtet, in der HL-Linie L-1236 wurde ein einzelner Basenaustausch in Exon 3 ermittelt, der zu einem Stopp-Codon führte (*nonsense*-Mutation), und in der HDLM-2-Zelllinie wurde eine Duplikation von 28 bp in Exon 5 ersichtlich. Wie aus den Elektropherogrammen aller dieser Sequenzen erkennbar war, konnten keine zusätzlichen Wildtyp-Sequenzen oder zusätzlich mutierte Sequenz-Varianten beobachtet werden. Dies weist auf den Verlust des zweiten Allels des TNFAIP3-Gens in diesen Zelllinien hin. Aus der HL-Zelllinie KM-H2 wurden zwei Sequenzvarianten

unterschiedlicher Länge ermittelt, die bei der direkten Sequenzierung eine partielle Doppelsequenz ergaben. Um diese Sequenzen auswerten zu können, wurde das entsprechende PCR-Produkt mittels des *pGEM[®]-T Easy Vektor Systems (Promega)* kloniert und die Plasmide aus 16 der resultierende Klone sequenziert. Hiermit wurde gezeigt, dass in einer der beiden Sequenzvarianten der TNFAIP3-Transkripte der KM-H2 die Exons 2 und 7 verbunden waren, während in der zweiten das Exon 2 mit einem Sequenzabschnitt von Intron 6 fusioniert waren. Letztere Variante wurde in 4 der sequenzierten Klone beobachtet. Dieses alternative Transkript wurde in keiner der anderen Zelllinien beobachtet.

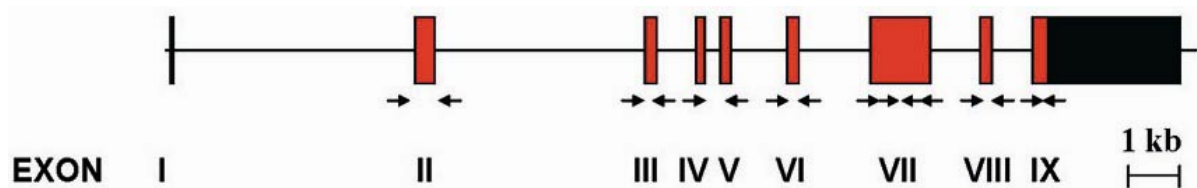


Abbildung 12: Genlocus des TNFAIP3-Gens. Abgebildet sind die 9 Exons des TNFAIP3-Gens. Die 8 codierenden Exons sind in Rot dargestellt; die Pfeile geben die verwendeten Oligonukleotide der genomischen PCR an.

In der Folge wurden alle codierenden Exons des TNFAIP3-Gens nach einer Runde PCR von genomischer DNA der untersuchten Zelllinien sequenziert (Abbildung 12). Im Fall der KM-H2 wurden für die Exons 3-6 dabei keine Produkte erhalten.

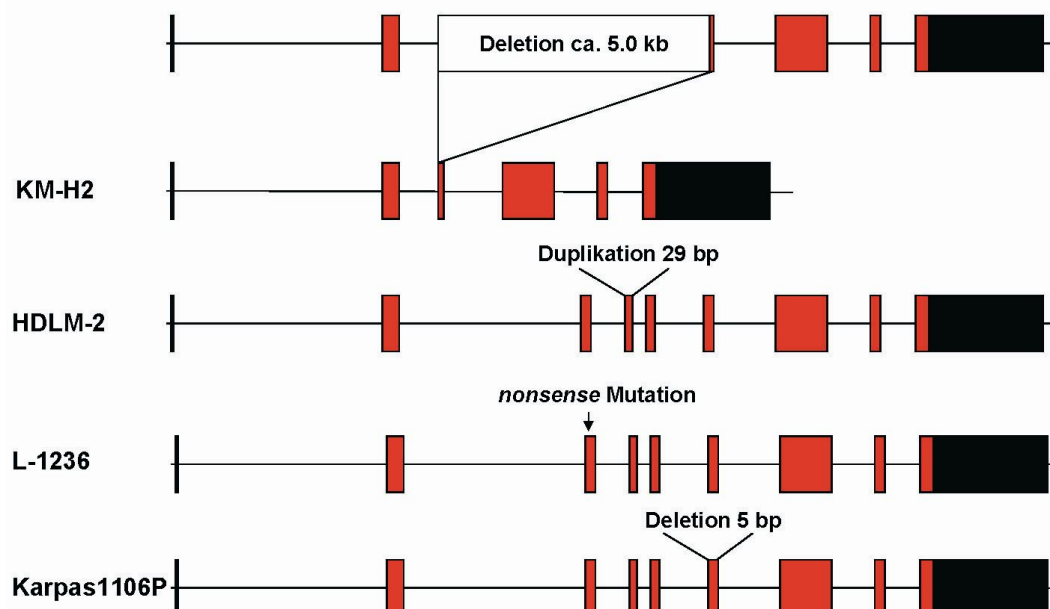


Abbildung 13: Mutationen im TNFAIP3-Gen in einer PMBL- und 3 HL-Zelllinien. Dargestellt sind die durch die Sequenzierungen des TNFAIP3-Gens ermittelten Mutationen in den A20-Protein-negativen Zelllinien. In der KM-H2 findet sich eine homozygote Deletion mit Bruchpunkten in Intron 2 und Exon 6; in der HDLM-2 wurde eine Duplikation von 29 Basenpaaren in Exon 4 ermittelt. In der L-1236 findet sich eine Basenaustausch-Mutation, die zu einem Stopp-Codon in Exon 3; in der Karpas 1106P ließ sich eine Deletion von 5 Basenpaaren in Exon 6 beobachten. Alle diese Mutationen liegen homozygot vor; sie erklären den fehlenden Nachweis von A20-Protein in diesen Linien.

Durch die ermittelten Sequenzen wurden die Ergebnisse, die zuvor auf cDNA gewonnen, bestätigt. In der KM-H2 legte das Ausbleiben der PCR-Produkte für die Exons 3-6 wie auch die Ergebnisse der Sequenzen, die von der cDNA gewonnen wurden, die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um einen homozygoten Verlust dieses Bereichs handeln könnte. Um dies zu überprüfen, wurde mit 5' des Exons 2 und 3' des Exons 7 gelegenen Oligonukleotiden eine PCR durchgeführt, die ein im Vergleich zur Wild-Typ-Sequenz um etwa 5 kb verkürztes Produkt erbrachte. Die anschließende Sequenzierung zeigte, dass eine Deletion mit Bruchpunkten im Intron 2 und in Exon 6 im TNFAIP3-Gen der KM-H2 Zelllinie vorlag.

Die so nachgewiesenen homozygoten Deletion konnte auch in einer unabhängigen Studie einer Kooperationsgruppe mittels aCGH nachgewiesen werden (Giefing et al. 2008). Interessanterweise besitzt die KM-H2-Zelllinie inaktivierende Mutationen beider NFkBIA-Allele, sodass in diesem Fall zwei Gene desselben Signalweges durch Mutationen inaktiviert sind.

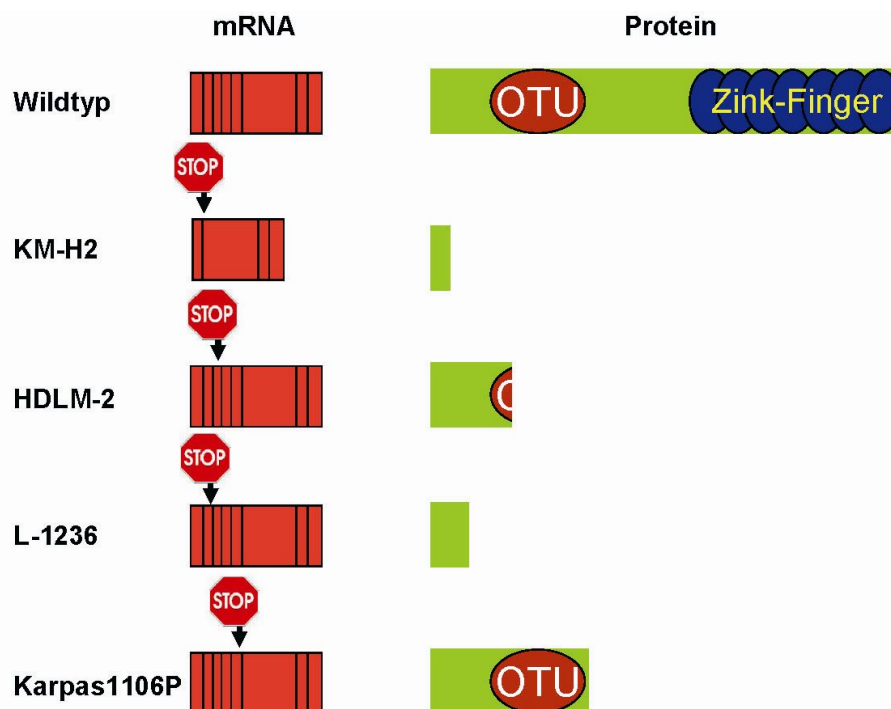


Abbildung 14: Die vorzeitige Stopp-Codons in den Linien würden zu stark verkürzten A20-Molekülen führen. Abgebildet ist die TNFAIP3-mRNA und die daraus resultierende Übersetzung in das A20-Protein. In der Wildtyp-Version besitzt das 953 Aminosäuren lange A20-Protein zwei funktionelle Domänen. Dies sind die N-terminal gelegene Eierstocktumor-Domäne (OTU) und die c-terminal gelegenen 7 A20-Zink-Finger. Im Falle der Mutationen in den untersuchten Zelllinien wären stark verkürzte A20-Moleküle das Ergebnis; keines dieser putativen Moleküle würde die C-terminal gelegenen Zink-Finger besitzen.

Der Verlust eines der beiden TNFAIP3-Allele in der L-1236-Zelllinie wurde wie im Fall der KM-H2 in einer Studie derselben Kooperationsgruppe durch SNP-Chip-Analysen nachgewiesen. Bemerkenswerterweise lassen sich in der chromosomalen Region der L-1236, in der TNFAIP3 liegt, durch zytogenetische Methoden keine Kopiezahlverluste nachweisen. Der Nachweis zweier maternalen Allele von TNFAIP3 in diesem Fall weist auf eine uniparentale Disomie hin (R. Siebert, persönliche Kommunikation).

Alle aus den Zelllinien ermittelten Sequenzvarianten führen, übertragen auf das A20-Protein, zu einem vorzeitigen Stopp-Codon. Im Fall der Deletionen bzw. Insertionen ist dies 5-18 Codons nach der Leserasterverschiebung der Fall.

Vermittelt durch den Prozess des *Nonsense-mediated mRNA decay* werden Transkripte, in denen vorzeitige Stopp-Codons liegen, in Zellen selektiv abgebaut (Behm-Ansmant et al. 2007). Trotzdem ließen sich Transkripte mit diesen Mutationen in den Zelllinien nachweisen. Aus diesem Grund kann die Ausprägung verkürzter A20-Proteine in den Zelllinien mit vorzeitigen Stopp-Codons nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden. Jedoch erscheint die Funktionalität solcher verkürzter A20-Proteine fragwürdig, da übertragen auf das A20-Protein die C-terminal gelegenen Zink-Finger in den A20-Proteinen fehlen würden. Wie in funktionellen Studien mit C-terminal-verkürzten A20-Proteinen gezeigt wurde, sind diese für die Inhibition von NF- κ B essentiell (O'Reilly und Moynagh 2003).

In der Folge wurden von 21 cHL-Fällen, darunter 10 EBV-positive und 11 EBV-negative, HRS-Zellen nach CD30-Färbung mittels Laser-Mikrodissektion einzeln isoliert und in Gruppen zu je 10-20 Zellen vereinigt. Zusätzlich wurden einzelne HRS-Zellen und Nicht-Tumorzellen gesammelt. Vorerst wurden alle codierenden Exons des TNFAIP3-Gens aus den HRS-Zellgruppen der 21 Fälle nach zwei Runden PCR sequenziert. Je Fall und Exon wurden so mindestens zweimal 10-20 Zellen untersucht. In Fällen, die Mutationen ergaben, wurden zusätzlich Nicht-Tumorzellen und je 3-5 Sequenzen aus HRS-Einzelnzellen der entsprechenden Stellen untersucht. Ferner wurden die untersuchten Fälle von einer Kooperationsgruppe mittels Interphase zytogenetischer Untersuchungen auf Verluste des TNFAIP3-Gen-Locus untersucht.

Die so ermittelten Sequenzen ergaben insgesamt in 9 der 21 untersuchten Fälle Mutationen im TNFAIP3-Gen (Tabelle 10). Alle so ermittelten Mutationen waren

klonal und somatischen Ursprungs, wie durch die TNFAIP3-Sequenzanalyse von einzelnen HRS-Zellen und Nicht-Tumorzellen gezeigt werden konnte.

Tabelle 10: Mutationen im TNFAIP3-Gen in HL-Zelllinien und primären HRS-Zellen

Probe	EBV	Subtyp	Mutationen ^a	Veränderung in der Peptidkette ^b	LOH/Del
L-428	-	NS			+
HDLM-2	-	NS (T-Zell-Ursprung)	dupl. 586-614	Leserasterverschiebung	+
DEV	-	NLP			-
KM-H2	-	NS	ΔIntron 2-Exon 6	Leserasterverschiebung	+
L-1236	-	MC	G491A	STOP	+
L-591	+	NS			-
1	+	NS	C2275A	Q737K	+
2	+	UN	G2317A	E751K	+
3	+	MC			n.a.
4	+	NS			n.a.
5	+	MC			-
6	+	LR			n.a.
7	+	NS			-
8	+	MC			-
9	+	UN			-
10	+	UN			+
11	-	NS			+
12	-	NS			-
13	-	MC			+
14	-	NS			n.a.
15	-	NS	Δ TGTTTCAG 215-221 / Δ C 1436	Leserasterverschiebung	-
16	-	NS	Δ 1824-1875	Leserasterverschiebung	+
17	-	NS	G1420T	STOP	+
18	-	NS	G2323A	A753T	+
19	-	NS	Δ GTTCTCG 811-817	Leserasterverschiebung	-
20	-	NS	Ins T 992-993	Leserasterverschiebung	-
21	-	UN	Δ GG 132-133 / T 971C	Leserasterverschiebung / L302P	+

Alle codierenden Exons des TNFAIP3-Gens wurden von 6 HL-Zelllinien und HRS-Zellen von 21 primären HL sequenziert. Im Fall der Untersuchung der primären HL wurden pro Fall und Exon mindestens 2x10 Zellen untersucht. Im Fall von Mutationen wurden die entsprechenden Abschnitte zusätzlich von HRS-Einzelnzellen und Nicht-Tumorzellen des entsprechenden Falls sequenziert, die einen somatischen Ursprung und die Klonalität der beobachteten Mutationen erkennbar werden ließen. Zusätzlich wurden die primären HL mittels Interphase-zytogenetischer Untersuchung auf chromosomale Verluste des TNFAIP3-Genlocus untersucht. Ferner wurden die Zelllinien L-428, KM-H2, L-1236, HDLM-2 mittels aCGH-Analysen auf Verluste dieses Genlocus untersucht. In etwa 45% aller untersuchten HL wurden Mutationen des TNFAIP3-Gens in den HRS-Zellen nachgewiesen. In der Mehrzahl der Fälle mit Mutationen ließen sich durch Interphase-zytogenetische Untersuchungen und/oder die Sequenzanalyse zudem Verluste des zweiten Allels erkennen. Auffällig war, dass Mutationen vor allem in HRS-Zellen von EBV-negativen HL beobachtet wurden.

^aentsprechend dem NCBI-Eintrag NM_006290.2;

^bentsprechend dem NCBI-Eintrag NP_006281;

Δ: Deletion; LOH: Allelverlust; Del, Deletion; n.a. nicht auswertbar; Ins, Insertion; NS, nodulär-sklerotisierend; MC, gemischtzellig; UN, unklassifizierbar; LR, Lymphozyten reich; NLP, nodulär Lymphozyten prädominant.

Unter den EBV positiven primären HL fanden sich 2 von 10 Fällen mit jeweils einer Mutation. Dies waren jeweils eine Basenaustausch-Mutation in Exon 9, die zu jeweils einem Aminosäuresäure-Austausch in den C-terminal gelegenen Zink-Fingern von A20 führen (Abbildung 15). Durch die Beobachtung von Einzelspitzen in den Sequenz-Elektropherogrammen wurde ersichtlich, dass kein zweites Allel des TNFAIP3-Gens in den HRS-Zellen dieser Fälle vorhanden war. Dieses Ergebnis wurde in einem der Fälle durch Interphase-zytogenetische Analysen bestätigt. Die Signal-konstellation dieser Analysen im anderen Fall deutete nicht auf einen Verlust der chromosomalen Region des TNFAIP3-Locus hin.

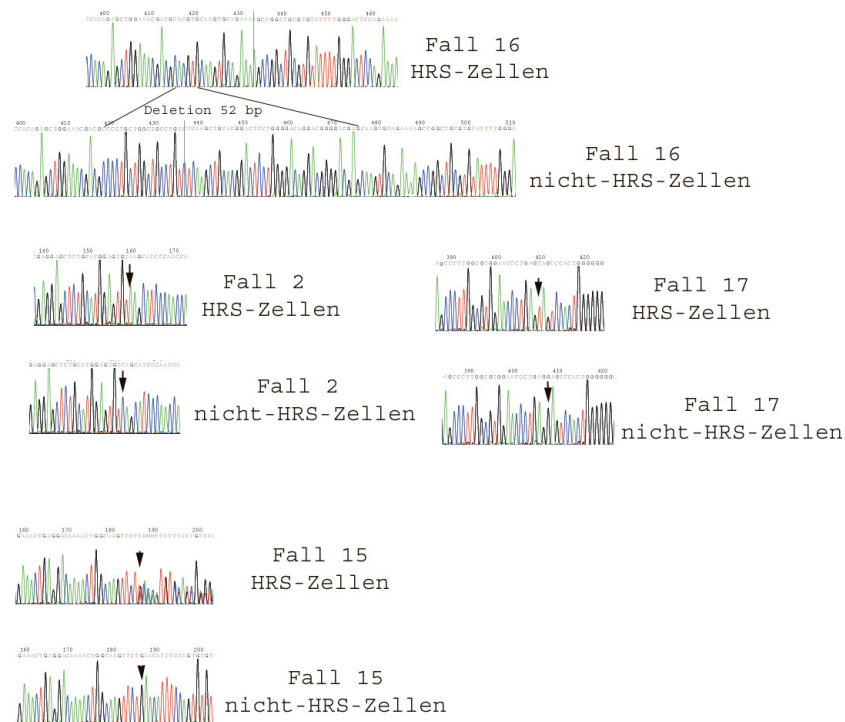


Abbildung 15: Homozygote und heterozygote Mutationen in TNFAIP3-Genen in HRS-Zellen. Dargestellt sind Beispiele der in den Sequenz-Elektropherogrammen beobachteten Mutationen. Oben: Eine 52 Basenpaare umfassende homozygote Deletion, angezeigt durch die Abwesenheit von Doppelspitzen in Sequenzen aus HRS-Zellen an diesen Stellen (Fall 16). Mitte: homozygote Basenaustausch-Mutationen in HRS-Zellen, die zu einem Aminosäureaustausch (Fall 2) bzw. zu einem vorzeitigen Stopp-Codon führen (Fall 17). Unten: heterozygoter Verlust von 7 Basenpaaren, angezeigt durch das Auftreten von Doppelspitzen (Fall 15). Alle diese Mutationen lassen sich nicht in den entsprechenden Nicht-HRS-Zellen finden.

Unter den EBV-negativen primären HL ließen sich 7 von 11 Fällen beobachten, in denen Mutationen in den HRS-Zellen erkennbar waren. Alle diese Mutationen führten mit Ausnahme eines Falles zu einem vorzeitiges Stopp-Codon auf mindestens einem Allel des TNFAIP3-Gens. In der Mehrzahl waren dies Deletionen und Insertionen von 1-52 bp, die alle zu einer Leserasterverschiebung führen. In den HRS-Zellen von 4 der 7 EBV-negativen HL mit Mutationen im TNFAIP3-Gen ließ sich ferner der Verlust eines der beiden Allele dieses Gens durch die Sequenzanalyse und Interphasezytogenetische Untersuchungen nachweisen. In einem der 3 EBV-negativen HL mit Mutationen, die keine Anzeichen eines Allel-Verlustes aufwiesen, wurden zwei Mutationen, jeweils Deletionen von 1 und 7 bp beobachtet. Die Zuordnung dieser zu den verschiedenen Allelen wurde jedoch aufgrund der großen Distanz auf genomischer DNA nicht untersucht.

Wie gezeigt werden konnte, verhalten sich die ermittelte Frequenz und das Mutationsmuster von TNFAIP3 in primären HL ähnlich wie in den Zelllinien. In der Zusammenfassung der Ergebnisse der Mutationsanalyse der primären HL und der

Zelllinien ergibt sich eine Mutationsfrequenz von 44% für alle untersuchten HL. Innerhalb der Gruppe der EBV-positiven HL liegt die Frequenz von Mutationen bei 18% (2/11), während 63% (10/16) aller EBV-negativen HL-Mutationen im TNFAIP3-Gen aufweisen. Bei Anwendung des exakten Fisher-Tests erreicht diese Verteilung statistische Signifikanz ($p=0,047$). Bei Unterscheidung der ermittelten Mutationen in solche, die einen Aminosäureaustausch verursachen, und jene, die ein vorzeitiges Stopp-Codon mindestens eines Allels zur Folge haben, steigt diese Signifikanz der Assoziation solcher Mutationen mit dem EBV-Status ($p=0,003$), bei 56% (9/16) in EBV-negativen HL und 0% (0/11) in EBV-positiven HL. Mutationen, die zu einem vorzeitigen Stopp-Codon bei gleichzeitigem Allelverlust führen, lassen sich mit Sicherheit in 38% (6/16) der EBV-negativen HL bestimmen.

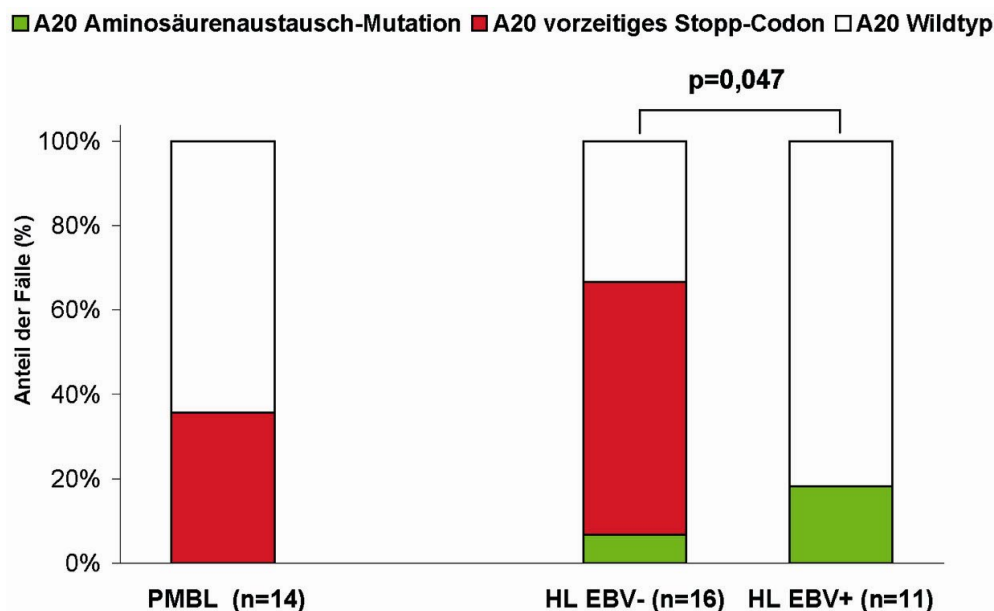


Abbildung 16: TNFAIP3-Mutationen in PMBL und EBV-positiven und EBV-negativen HL. Dargestellt ist das Verhältnis der Fälle mit Mutationen, gemäß der entsprechenden Lymphome. Ferner wird unterschieden in EBV-negative und EBV-positive HL. Rot markiert ist der Anteil der Lymphom-Fälle, in denen sich auf mindestens einem Allel eine TNFAIP3-Mutation findet, die zu einem vorzeitigen Stopp-Codon führt. Das Auftreten von Mutationen lässt sich in signifikanter Weise in HRS-Zellen von EBV-negativen HL beobachten ($p=0,047$, Fishers Exakter Test).

Die Tumorzellen des PMBL sind, wie HRS-Zellen auch, in ihrem Überleben abhängig von konstitutiver NF- κ B-Aktivität (Feuerhake et al. 2005). Der Befund der offensichtlichen Inaktivierung des TNFAIP3-Gens in der PMBL-Zelllinie Karpas-1106P war ein erster Hinweis auf eine pathogenetische Rolle von TNFAIP3-Mutationen auch in PMBL. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden alle codierenden Exons des TNFAIP3-Gens nach einer Runde PCR von Ganzschnitt-DNA von 13 PMBL sequenziert.

Tabelle 11: Mutationen des TNFAIP3-Gens in einer PMBL-Zelllinie und primären PMBL

Probe	Mutationen ^a	Veränderung in der Peptidkette ^b
Karpas-1106P	Δ TCATC1037-1041 ^c	Leserasterverschiebung
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10	C635A / Δ CAGAGAAAACAAA 1959-1971 + 8 bps (Spleiß-Donor Stelle) ^d	STOP / Leserasterverschiebung
11	Ins A389 / T2382G / A2409T / T2437C / A2439G ^e	Leserasterverschiebung / N772K/ E781D / STOP>Q / STOP>Q
12	T1070C	STOP
13	Δ AG1294-1295 ^c	Leserasterverschiebung

Alle codierenden Exons des TNFAIP3-Gens wurden von Ganzschnitt-DNA von 13 primären PMBL sequenziert. Hierbei ließen sich 4 primäre Fälle identifizieren, die inaktivierende Mutationen auf mindestens einem der TNFAIP3-Allele trugen.

^aentsprechend dem *NCBI*-Eintrag NM_006290.2; ^bentsprechend dem *NCBI*-Eintrag NP_006281; ^cAllelverlust, wie durch Sequenz Analyse ermittelt wurde; ^ddurch bakterielle Klonierung konnten die Mutationen den zwei verschiedenen Allelen zugeordnet werden; ^edurch bakterielle Klonierung konnten die Basenaustausch-Mutationen einem Allel zugeordnet werden. Die Zugehörigkeit der Insertions-Mutation konnte aufgrund der großen Distanz auf genomischer DNA nicht ermittelt werden. Δ: Deletion; Ins, Insertion;

Gemeinsam mit dem Ergebnis der Zelllinie zeigten sich Mutationen in 5 von 14 (36%) untersuchten PBML. Der somatische Ursprung dieser Mutationen konnte mangels Nicht-Tumor-Gewebe nicht überprüft werden. Alle dieser Mutationen haben vorzeitige Stopp-Codons mindestens auf einem Allel dieser Fälle zur Folge. In mindestens 3 der 5 mutierten PMBL waren beide Allele betroffen, entweder durch Verlust des zweiten Allels, wie durch die Sequenz-Elektropherogramme ersichtlich wurde, oder durch zwei Mutationen, die auf beide Allele verteilt waren. Dies wurde in Fall 10 mittels der Klonierung eines PCR-Produkts, das beide Positionen der Mutationen beinhaltete, nachgewiesen. Die Auswertung der gewonnenen 22 TNFAIP3-Sequenzen zeigte, dass 10 und 9 der resultierenden Klone jeweils entweder die Mutation an Position 635 oder die Mutation an Position 1956 enthielten. Zwei der Sequenzen zeigten keine Mutationen, während eine der Sequenzen beide Mutationen enthielt. Die beiden letzten Sequenzen stammen wahrscheinlich von Nicht-Tumorzellen, bzw. von PCR-Hybridartefakten. Die theoretische Möglichkeit von mehr als zwei Genkopien im Tumorklon, von denen mutierte und unmutierte Varianten existieren, erscheint aufgrund der Prädominanz der anderen Varianten unwahrscheinlich.

In Fall 11, der 4 Basenaustausch-Mutationen zwischen den Positionen 2382 und 2439 und eine Insertion an der Position 389 zeigte, wurde durch Klonierung des Produkts, das die 4 Basenaustausche aufwies, gezeigt, dass diese auf einem Allel liegen. So zeigten die Fälle 8 und 5 von den 13 auswertbaren Sequenzen der

erzeugten Klone jeweils entweder keine Mutationen oder alle vier Mutationen an den beschriebenen Stellen. Dies könnte bedeuten, dass eines der Allele im Lauf der Tumorgenese dieses PMBL durch vier Austausch-Mutationen beschädigt wurde, während das andere Allel durch die Insertion inaktiviert worden sein könnte.

Wie beschrieben, zeigt auch die Untergruppe der ABC-ähnlichen-DLBCL eine für das Überleben der Tumorzellen notwendige konstitutive NF- κ B-Aktivität (Davis et al. 2001). Daher wurde auch diese Gruppe von Lymphomen auf Mutationen im TNFAIP3-Gen untersucht. Hierzu wurden von einer Kooperationsgruppe Gewebeschnitte von DLBCL mittels immunhistochemischen Färbungen auf nukleäre Ausprägung von BCL6, MUM1 und Membranausprägung von CD10 untersucht. So wurden 10 Fälle als ABC-ähnliche-DLBCL und 2 Fälle als GCB-ähnliche-DLBCL, gemäß dem in Abschnitt 3.3.1 beschriebenen Kriterien klassifiziert. Von diesen 12 DLBCL wurden ebenso alle codierenden Exons des TNFAIP3-Gens nach einer Runde PCR sequenziert. Die Sequenzierung dieser DLBCL zeigte in keinem der untersuchten Fälle Mutationen.

Bei Betrachtung der Verteilung aller beobachteten Mutationen in HL und PMBL übersetzt auf das A20-Protein fallen folgende Merkmale auf (Abbildung 17): Es scheint keine Stellen im TNFAIP3-Gen zu geben, an denen Mutationen sehr stark gehäuft auftreten. Betrachtet man die Verteilung der Mutationen, deren Positionen sich auf den 8 codierenden Exons des TNFAIP3-Gens eindeutig bestimmen lassen, fällt auf, dass etwa 30% der Mutationen in Exon 9 liegen, welches etwa 12% der codierenden Region von TNFAIP3 repräsentiert. Allerdings scheint Fall 11 der PMBL mit 4 Mutationen in Exon 9 dieses Verhältnis stark zu beeinflussen. Ohne diesen Fall wäre das Verhältnis aus Mutationslokalisationsfrequenz und Länge des Exons 16% zu 12%.

Tabelle 12: Lokalisation der Mutationen im TNFAIP3-Gen in HL und PMBL

Positionen der Mutationen (Exon-Länge in bp)	Anzahl der ermittelten Mutationen (N=23)
Exon 2 (294)	2
Exon 3 (190)	2
Exon 4 (147)	2
Exon 6 (180)	4
Exon 7 (919)	6
Exon 9 (284)	7

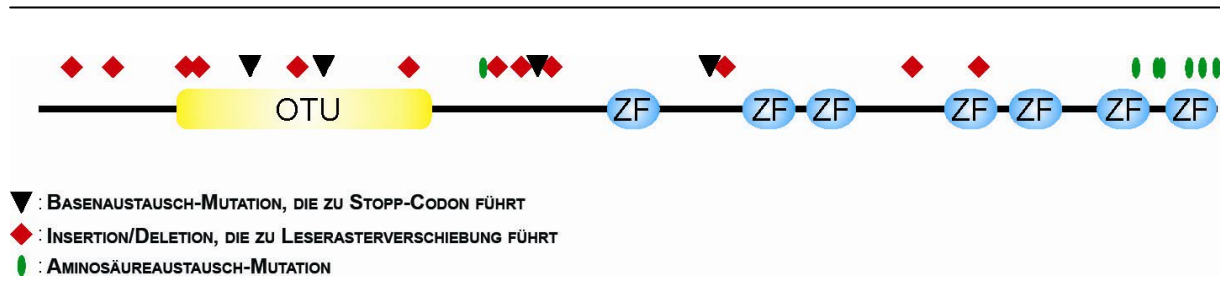


Abbildung 17: Maßstabsgetreue Darstellung der Verteilung aller ermittelten Mutationen übertragen auf das A20-Protein. Abgebildet sind die Positionen der Mutationen übertragen auf das A20-Protein, unterschieden nach ihrer funktionellen Konsequenz. Auffällig ist, dass die große Mehrzahl der Mutationen, die zu einem vorzeitigen Stopp-Codon führen, in der Mehrzahl der Fälle in der N-terminalen Hälfte des A20-Proteins liegt. Die überwiegende Zahl der Mutationen, die einen Aminosäure-Austausch zur Folge haben, ist in den C-terminal gelegenen Zink-Fingern lokalisiert.

Auffällig bei der Verteilung der Mutationen auf das TNFAIP3-Gen, eingeteilt nach deren funktioneller Konsequenz, erscheint jedoch, dass 7 von 8 Mutationen, die einem Aminosäureaustausch im A20-Protein zur Folge haben, in Exon 9 gelegen sind. Übertragen auf das A20-Protein scheinen demnach Aminosäureaustausche gehäuft in den beiden C-terminal gelegenen Zink-Fingern aufzutreten. Einschränkend bleibt bei dieser Betrachtung jedoch anzumerken, dass – wie oben erwähnt – Fall 11 der PMBL dieses Verhältnis stark beeinflusst.

Ferner fällt auf, dass die Mutationen, die ein vorzeitiges Stopp-Codon zur Folge haben, übertragen auf das A20-Protein gehäuft in der C-terminal gelegenen Hälfte des Proteins liegen. In den daraus theoretisch resultierenden A20-Peptiden würden demzufolge in 14 von 16 der von den mutierten Allelen codierten putativen A20-Molekülen 6 der 7 C-terminalen Zink-Finger fehlen.

3.3.4.2 Funktionelle Untersuchungen zur Bedeutung von TNFAIP3-Mutationen in HL-Zelllinien

Die durch die Mutationsanalyse gewonnene Hypothese, dass A20-Inaktivierung einen Beitrag zur konstitutiven NF- κ B/Aktivität im HL und PMBL leistet, sollte in der Folge funktionell belegt werden. Hierzu wurde durch Gen-Transfer das Wildtyp-TNFAIP3-Gen in den Zelllinien ausgeprägt, in denen keine A20-Proteine nachweisbar waren, und die Konsequenzen dieser Ausprägung in den Zelllinien beobachtet. Zu Kontrollzwecken sollte in separaten Ansätzen ebenfalls ein für den NF- κ B-Signalweg irrelevantes Protein und der I κ B α ^{S32,36A}-Superrepressor ausgeprägt werden. Letzterer ist eine Variante des I κ B α -Proteins, in dem die Serin-Reste an den Positionen 32 und 36 gegen Alanin-Reste ausgetauscht sind. Diese Modifizierung bewirkt, dass das I κ B α -Protein nicht mehr durch den IKK-Komplex phosphoryliert und in der Folge abgebaut werden kann (Traenckner et al. 1995). Um

die Spezifität der Effekte dieser Protein-Ausprägungen in den TNFAIP3-mutierten Linien weiter zu überprüfen, sollten weitere Zelllinien der gleichen Prozedur unterworfen werden, die entweder konstitutive NF- κ B-Aktivität bei Wildtyp-A20-Ausprägung besitzen oder keine konstitutive NF- κ B-Aktivität und damit verbunden fehlende Ausprägung von A20 zeigen. Eine mögliche Auswertung der Effekte dieser A20-Ausprägung könnten Untersuchungen zu Proliferation und Überleben der Zellen, zur transkriptionellen Aktivität von NF- κ B und direkter Effekte von A20, wie z.B. der Untersuchungen zur Stabilität von RIP1, sein. Die hierzu zur Verfügung stehenden zahlreichen experimentellen Methoden bedürfen in der überwiegenden Mehrzahl dieser Protokolle hoher Zellzahlen. Wie sich jedoch herausstellte, konnten nur geringe Zellzahlen der HL-Zelllinien erzielt werden, in die das TNFAIP3-Gen erfolgreich übertragen werden konnte.

Zunächst wurde ein episomales Vektorsystem benutzt (pRTS), das als Plasmid durch einen EBV-Replikationsursprung und Ausprägung des viralen EBNA1-Genes episomal stabil persistiert (Bornkamm et al. 2005). Das Plasmid besitzt ferner einen Tetrazyklin-regulierten bidirektionalen Promotor, der die Transkription des Zielgens und Reporter-Gens steuert, sowie ein Puromycin-Resistenz-Gen. Dieses Plasmid ist aufgrund dieser Eigenschaften je nach eingefügtem Zielgen ca. 18-20 kb groß. In der Version, die von einer Kooperationsgruppe zur Verfügung gestellt wurde, war an der Stelle des Zielgens das Luziferase-(Luc)-Gen aus *Photinus pyralis* (Feuerfliege) enthalten. Als Reporter-Gen befand sich zusätzlich eine Version des humanen Nerven-Wachstumsfaktor-Rezeptors (*NGFR*), der auf der Oberfläche der Zellen ausgeprägt wird und dem die zytoplasmatische Signaldomäne fehlt.

Die Insertion des NFKBIA^{S32,36A}-Gens wurde durch Einsetzen dieses DNA-Abschnitts aus einer Variante des pRTS von einer weiteren Kooperationsgruppe durchgeführt und durch Sequenzierung überprüft. Die Insertion des TNFAIP3-Gens geschah mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Klons, der diesen DNA-Abschnitt enthielt (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung, C956IRAKp961B0248-RZPDM13F). Hierzu wurden mittels PCR die entsprechenden Restriktionsendonuklease-Erkennungsstellen und vor dem Start-Codon des Gens eine *Kozak-Konsensu*-Sequenz (Translationsinitiationsstelle) angehängt und nach Insertion in den pRTS durch Sequenzierung überprüft. Dabei fiel auf, dass der kommerziell erworbene Ursprungsklon, der den codierenden Bereich für A20 enthielt, eine Basenaustausch-Mutation im hinteren Drittel der codierenden Sequenz trug, die zu

einem vorzeitigen Stopp-Codon führte. Aus diesem Grund wurde diese Variante mittels *in vitro*-Mutagenese so verändert, dass die Wildtyp-TNFAIP3-Sequenz erhalten wurde.

Wie in der Vergangenheit gezeigt werden konnte, lassen sich HL-Zelllinien mittels des *Amara*-Nukleofektion-Systems effizient transfizieren (Ushmorov et al. 2004; Holtick et al. 2005; Hirsch et al. 2008). Aus diesem Grund wurden für die zu untersuchenden Zelllinien KM-H2, L-1236, L-428 und Karpas-1106P entsprechende Nukleofektion-Protokolle etabliert. Dies geschah ferner für die BL-Zelllinie Raji, die GC-B-DLBCL-Linie Karpas-422 und die MM-Zelllinie U-266. Wie durch FACS-Untersuchung ersichtlich wurde, zeigte keine der untersuchten Zelllinien endogene NGFR-Ausprägung. Die Lymphom-Zelllinie Raji zeigt besonders hohe Proliferationsraten und lässt sich sehr effizient transfizieren und wurde daher zur Etablierung der Transfektionsexperimente verwendet. Sie besitzt wie die GC-B-DLBCL-Zelllinie keine oder nur schwache transkriptionelle NF- κ B-Aktivität. Die U-266, die von multiplen Myelom-Zellen abstammt, zeigt hingegen konstitutive NF- κ B-Aktivität bei Wildtyp A20-Ausprägung ebenso wie die HL-Linie L-428. Beide Zelllinien sollten als eine Kontrolle des Effekts der A20-Ausprägung dienen. Bemerkenswerterweise ist das NFKBIA-Gen in den HL-Zelllinien KM-H2 und L-428 durch Mutation inaktiviert, so dass sich in diesen Linien kein I κ B α -Protein nachweisen lässt.

Die Etablierung der entsprechenden Protokolle geschah durch Nukleofektion eines ca. 3 kb großen Kontrollplasmids, das konstitutiv GFP ausprägt, und darauf folgender durchflusszytometrischer Bestimmung des Anteils grün-fluoreszierender Zellen 24 h nach Nukleofektion. Mit Ausnahme der Karpas-1106P-Linie konnten so für alle zu untersuchenden Zelllinien Transfektionseffizienzen zwischen 30% und 70% erreicht werden. Bei diesen Experimenten fiel auf, dass große DNA-Mengen die Transfektionseffizienz drastisch erniedrigten. In diesen Fällen war ein großer Anteil toter oder apoptotischer Zellen zu beobachten.

Die Nukleofektion des pRTS, welcher das Luc-Gen beinhaltet, wurde vorerst in der Raji-Zelllinie durchgeführt. Nach 24 h wurden die Zellen durch Addition von Doxycyclin induziert und nach weiteren 24, 48 und 72 h konnte die Transfektionseffizienz durchflusszytometrisch durch den Nachweis von NGFR-Ausprägung auf den Zellen bestimmt werden. Es wurde dabei kein wesentlicher Unterschied im Anteil NGFR-ausprägender Zellen zwischen den unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Induktion beobachtet. Jedoch war im Vergleich zur Kontroll-Nukleofektion mit

dem ca. 3 kb großen GFP-codierenden Plasmid die Transfektionseffizienz mit dem pRTS um etwa 75% niedriger. Dies könnte damit zu erklären sein, dass die Masse der eingesetzten DNA der beiden Ansätze gleich war, jedoch aufgrund des Größenunterschieds beider Plasmide vom pRTS-Plasmid nur ein Sechstel der Menge an DNA-Molekülen im Vergleich zum Kontrollplasmid eingesetzt wurde. Mit dem pRTS ergab sich so für die Raji-Zelllinie eine Transfektionseffizienz von etwa 10-15%.

Da das pRTS-Plasmid ein Puromycin-Resistenzgen beinhaltet, wurden in folgenden Experimenten Zellen mittels Puromycin-Zugabe selektiert. Die Raji-Zelllinie wurde mit den oben beschriebenen pRTS-Plasmiden Luc, $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ und A20 transfiziert und nach 48 h mittels Puromycin-Zugabe selektiert. Durch die Selektion wurde nach einer Woche eine Zunahme des Verhältnisses von NGFR-ausprägenden Zellen zur gesamten Lebend-Zellzahl von bis zu 100% in Vergleich zu transfizierten, nicht selektionierten Zellen beobachtet.

Um die Ausprägung der Zielgene durch die pRTS-Plasmide zu untersuchen, wurden von den entsprechend transfizierten Raji-Zellen 24, 48 und 72 h nach Induktion Protein-Lysate gewonnen. Ebenso wurden von transfizierten, nicht-induzierten Zellen Protein-Lysate hergestellt. Diese wurden durch *Western-Blot* Analysen jeweils auf Ausprägung der Proteine codiert von den transfizierten Genen untersucht (Abbildung 18). Zu diesem Zeitpunkt prägten etwa 30% der Zellen den NGFR aus.

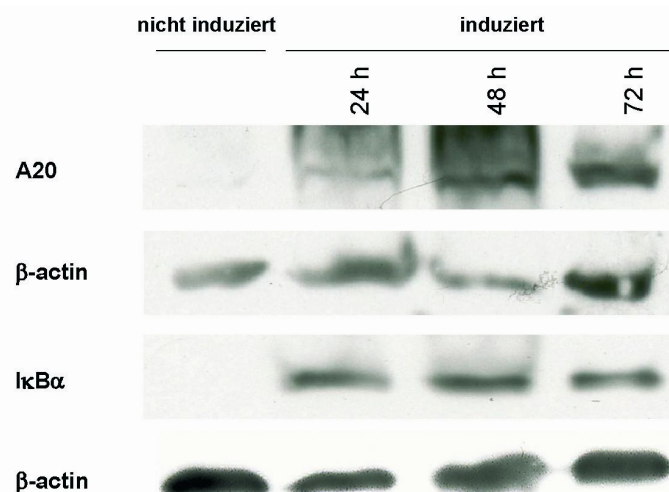


Abbildung 18: Ausprägung von A20 und $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ in mit den Tetracyclin-regulierbaren pRTS-Plasmiden transfizierten Raji-Zelllinien 24, 48 und 72 h nach und ohne Induktion. Raji-Zellen wurden durch Nucleofektion jeweils mit den pRTS-A20- und pRTS- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Plasmiden transfiziert und ca. eine Woche lang mit Puromycin selektioniert. Diese Zellen wurden separat voneinander 24, 48 und 72 h induziert, anschließend wurden Protein-Lysate von diesen Zellen gewonnen. Ebenso wurden Protein-Lysate von transfizierten, selektionierten, nicht-induzierten Zellen gewonnen. Alle diese Lysate wurden mittels *Western-Blot* auf Ausprägung der entsprechenden Proteine analysiert. Die fehlende Nachweisbarkeit von A20 bzw. $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ in den entsprechend transfizierten nicht-induzierten Zellen demonstriert die strikte Regulation durch den Tetracyclin-induzierbaren Promotor. Ferner lässt sich starke Protein-Ausprägung in den induzierten Zellen beobachten.

Durch die Beobachtung der Proteinbanden von Zellen, die mit dem pRTS-A20-Plasmid transfiziert wurden, auf der Höhe von ca. 80 kDa und Proteinbanden von Zellen, die mit dem pRTS-I κ B α transfiziert wurden, auf der Höhe von 40 kDa wurde deutlich, dass die entsprechenden Proteine in voller Länge und stark ausgeprägt werden. Zusätzliche Proteinbanden waren nicht zu erkennen. Im Fall der Transfektion mit dem pRTS-A20 wurde ein Anstieg der A20-Ausprägung im Vergleich dieser Zeitpunkte beobachtet.

Nachdem in diesen Experimenten die Funktionalität, Regulierbarkeit und Selektionierbarkeit der entsprechenden Plasmide gezeigt wurde, wurden HL-Zelllinien mit den beschriebenen pRTS-Plasmiden transfiziert. Dementsprechend wurden die HL-Zelllinien L-1236, L-428 und KM-H2 mit den beschriebenen pRTS-Plasmiden transfiziert, induziert und durch FACS-Analyse auf Ausprägung des NGFR untersucht (Abbildung 19).

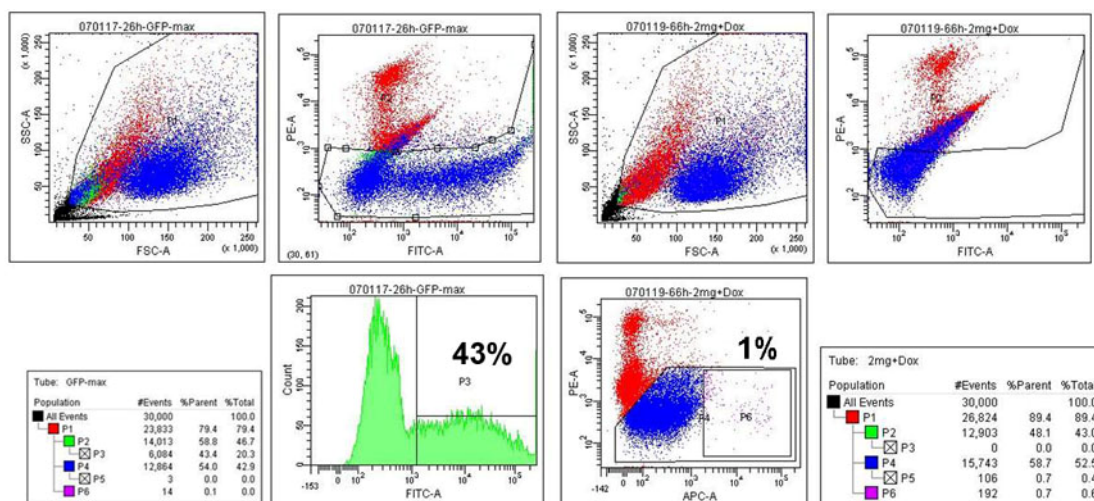


Abbildung 19: Transfektionseffizienzen der KM-H2-Zelllinie durch Amaxa-Nucleofektion. KM-H2-Zellen wurden durch Nucleofektion mit dem konstitutiv GFP-ausprägenden Kontroll-Plasmid transfiziert und 24 h nach Transfektion mittels FACS-Untersuchung auf GFP-Ausprägung analysiert (links). KM-H2-Zellen wurden mit dem pRTS-Plasmid transfiziert, induziert und nach 24 h durch einen APC-gekoppelten Antikörper auf NGFR-Ausprägung durch FACS untersucht (rechts). In der Kontroll-Nucleofektion (links) lassen sich etwa 43% GFP-ausprägende, transfizierte KM-H2-Zellen nachweisen. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Transfektion des pRTS-Plasmids ein deutlich niedrigerer Anteil an positiv transfizierten Zellen (1%).

Es zeigte sich, dass im Gegensatz zur gleichzeitigen Kontroll-Nukleofektion mit dem 3 kb Kontrollplasmid die Transfektionseffizienz mit dem pRTS dramatisch niedriger lag. So konnten von den mit dem pRTS transfizierten Zellen nur bis zu 1% erfolgreich transfizierter Zellen nachgewiesen werden. Bei der Kontroll-Transfektion konnten dagegen bis zu 45% transfizierter Zellen ermittelt werden. Die Verwendung höherer

oder niedriger Mengen Doxycyclin zur Induktion oder unterschiedliche Zeiträume der Induktion erbrachte ein ähnliches Resultat.

Die mit den pRTS-Plasmiden transfizierten Zellen wurden in der Folge mittels Puromycin-Zugabe selektioniert. Jedoch konnte auch nach mehreren Wochen dieser Selektion keine Zunahme der NGFR-ausprägenden Zellen beobachtet werden.

Aufgrund dieser fehlgeschlagenen Versuche, A20- und $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Ausprägung in den zu untersuchenden Zelllinien mittels der beschriebenen Transfektions-Methode zu realisieren, wurde der viral-vermittelte Gentransfer durchgeführt. In HL-Zelllinien konnte dies bislang mit Adenoviren und Lentiviren erfolgreich praktiziert werden (Hinz et al. 2001; Horie et al. 2002; Kashkar et al. 2006). Aufgrund bestehender Erfahrungen mit dem lentiviralen Transfer von kleinen Haarschleifen-bildenden RNA (shRNA) in der Arbeitsgruppe wurde auf diese Technik des Gentransfers zurückgegriffen. Hierzu musste vorerst ein Plasmid erzeugt werden, mit dem die entsprechenden Gene lentiviral-vermittelt ausgeprägt werden können. Die Grundlage dafür bildete das kommerziell erhältliche Plasmid pGIPZshRNA, welches im Originalzustand nach Integration in das Wirtsgenom zur Ausprägung eines durch einen CMV-Promoter initiierten polycistronischen Transkripts führt, das neben einem GFP-Gen und einem Puromycin-Resistenz-Gen die gewünschte shRNA codiert. Auf diesem Transkript liegt die GFP-Gensequenz unmittelbar flussabwärts des Promoters, gefolgt von einer internen-Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES), der Puromycin-Resistenz-Gensequenz und der shRNA-Sequenz.

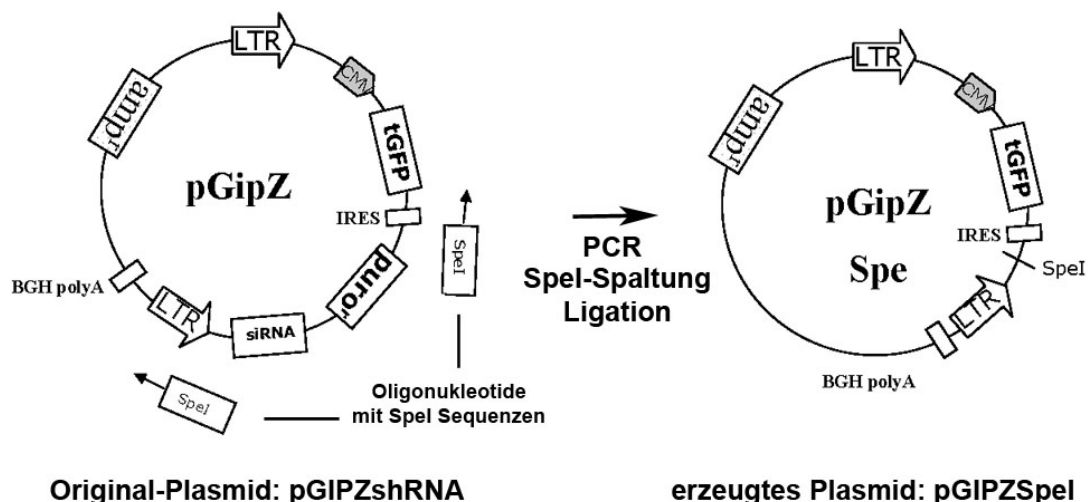


Abbildung 20: Erzeugung des lentiviralen Ausprägungs-Konstrukts pGIPZ-Spe. Der lentivirale Ausprägungsvektor pGIPZ-Spe wurde durch PCR von dem Ursprungs-Plasmid pGIPZ shRNA (Open Biosystems) erzeugt. Hierzu wurden Oligonukleotide verwendet, die 3' der IRES-Sequenz und 3' der shRNA-Sequenz lagen. Diese besaßen zusätzlich Restriktionserkennungsstellen des Enzyms SpeI. (CMV = CMV-Promotor; tGFP = GFP-Gen; IRES = interne Ribosomen-Eintrittsstelle; puro = Puromycin-Resistenz-Gen; shRNA = kleine Haarschleifenbildende RNA-Sequenz; LTR = Integrations- und Transkriptions-Initiationsstelle des Lentivirus.)

Zur Erzeugung des gewünschten lentiviralen Plasmids wurde das Original-Plasmid mittels PCR so vermehrt, dass ein neues Plasmid-Molekül (pGIPZ-Spel) entstand, in dem die Puromycin-Resistenz-Gensequenz und die shRNA-Sequenz fehlten, und zusätzlich hinter der IRES-Sequenz eine Erkennungs-Sequenz des Restriktions-enzym Spel erzeugt wurde.

Der Einbau der codierenden Sequenzen der Gene TNFAIP3, NFKBIA^{S32,36A} und Luc vor diese IRES-Sequenz in den pGIPZ-Spe erfolgte über die Erzeugung von PCR-Produkten, die an den Enden eine Spel-Erkennungsstelle besaßen. Als Matrize hierfür dienten die zuvor bearbeiteten pRTS-Plasmide. Demnach ergab sich aus dem erzeugten lentiviralem Konstrukt ein polycistronisches Transkript, welches – initiiert durch den CMV-Promoter – GFP, die IRES-Sequenz und das entsprechende Zielgen enthielt.

Zur Virusproduktion wurden zunächst die Konstrukte pGIPZ-Spel-A20, pGIPZ-Spel-IkB α und pGIPZ-Spel verwendet. Letzteres codiert ausschließlich für GFP ohne Insertion einer Gen-Sequenz hinter der IRES-Sequenz. Die Titration dieser Viren wurde nach Infektion von 293-Zellen mit den erzeugten Lenti-Viren durch Ermittlung des Verhältnisses GFP-ausprägender Zellen zur Gesamtzellzahl durchflusszyto-metrisch ermittelt. Bei den so untersuchten viralen Konstrukten fiel eine negative Korrelation zwischen den Virustitern und der Länge der inserierten Gensequenz auf. So ergab sich für das Konstrukt mit der längsten inserierten Sequenz pGIPZ-Spel-A20 (2,2 kb) ein Titer von $0,5 \times 10^7$ Viruspartikel/ml, für pGIPZ-Spel-IkB α mit einer inserierten Sequenz von 0,9 kb ein Titer von 1×10^7 Viruspartikel/ml und für pGIPZ-Spel ohne inserierte Sequenz ein Titer von 2×10^7 Viruspartikel/ml. In der Folge wurde für die zu untersuchenden NHL- und HL-Zelllinien die *multiplicity of infection* (MOI) bestimmt. Diese Kenngröße gibt die Menge an Viruspartikeln an, bei der sich die entsprechenden Zelllinien mit der größten Effizienz infizieren lassen. Hierbei ergab sich, dass die NHL-Zelllinien nur unzureichend zu infizieren waren. Für die HL-Zelllinien ergaben sich Transduktionseffizienzen zwischen 10-50%. Die transduzierten Zellen zeigten dabei im FACS sehr starke Fluoreszenz-Signale für GFP (Abbildung 21):

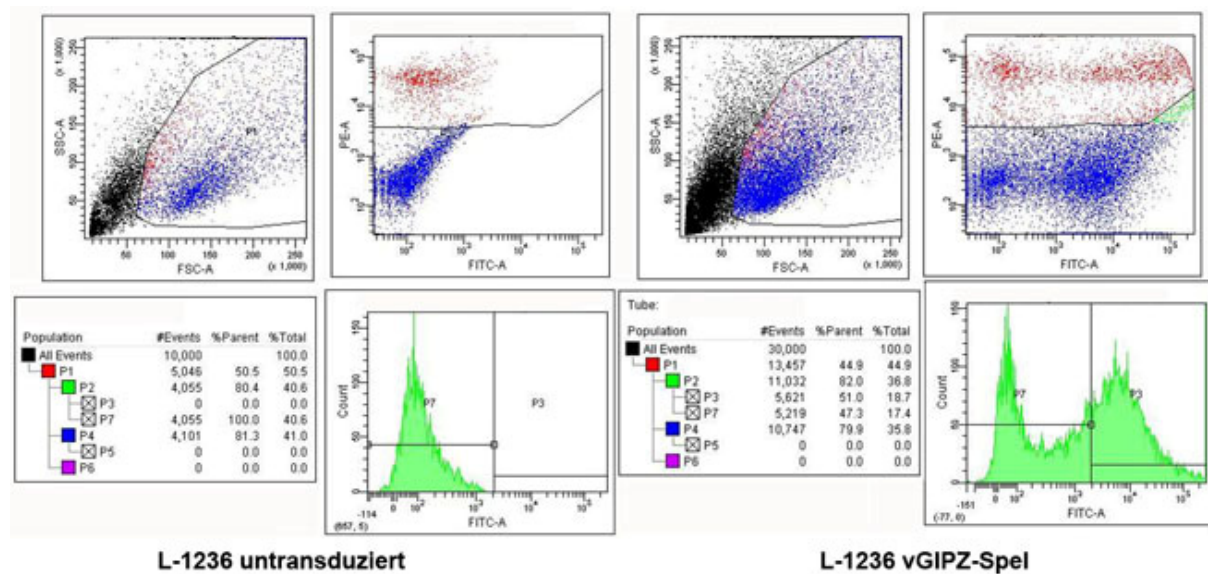


Abbildung 21: Transduktionseffizienzen der L-1236-Zelllinie durch vGIPZ-Spel. L-1236-Zellen wurden mit dem Virus vGIPZ-Spel infiziert und nach 3 Tagen durch FACS-Untersuchung auf Ausprägung des GFP-Gens untersucht. Ebenso wurden nicht-transduzierte L-1236-Zellen durch FACS auf GFP-Ausprägung untersucht. In den mit dem Virus infizierten Zellen ließen sich ca. 50% GFP-ausprägende Zellen nachweisen. Es konnte beobachtet werden, dass diese GFP-Signale in den Zellen von besonders hoher Intensität waren.

In der Folge wurden die HL-Zelllinien L-1236, KM-H2 und L-428 mit den Lentiviren der drei Konstrukte infiziert und aufgrund der zum Teil geringen Transduktions-Effizienzen mittels Durchflusszytometrie 5.000-10.000 Zellen sortiert. Die entsprechend transduzierten Linien wurden in der Folge mittels quantitativer (q)PCR auf die Ausprägung dreier NF- κ B-Zielgene untersucht. Dies waren ICAM1, BIRC3 und LTA, die zuvor in funktionellen Studien mit den verwendeten HL-Linien durch Ausprägung des I κ B α -Superrepressors infolge verminderter transkriptioneller NF- κ B-Aktivität als differentiell reguliert identifiziert wurden (Hinz et al. 2002). Die Normalisierung der ermittelten Werte dieser Gene erfolgte gegen GAPDH.

Die Auswertung der qPCR erbrachte in keiner der untersuchten Zelllinien eine transkriptionelle Regulation dieser Gene durch die Ausprägung von A20 oder I κ B α ^{S32,36A} im Vergleich zu den Zellen der jeweiligen Zelllinien, die mit dem nur GFP-ausprägenden Virus infiziert worden waren. Um die Protein-Ausprägung der durch die Lentiviren eingebrachten Gene zu untersuchen, wurden L-428, KM-H2 und L-1236 erneut infiziert und mittels FACS jeweils ca. 1×10^6 GFP-positive-Zellen sortiert. Von diesen wurden Protein-Lysate angefertigt und durch *Western-Blot* auf Ausprägung von I κ B α und A20 untersucht. Ferner wurden Protein-Lysate von 293-Zellen, die mit dem pGIPZ-Spe-A20-Plasmid transduziert waren, auf A20-Protein-Ausprägung untersucht (Abbildung 22):

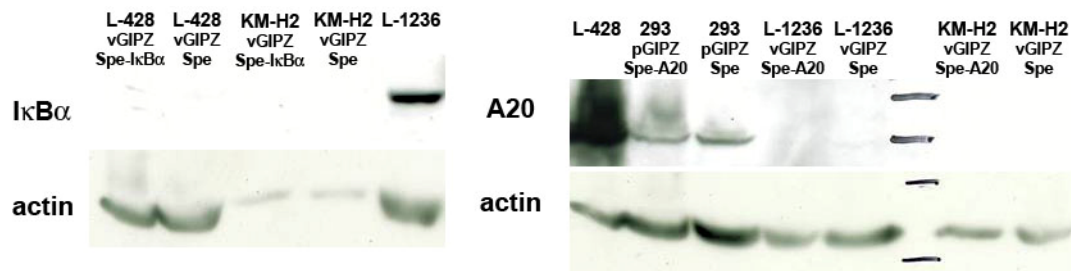


Abbildung 22: Ausprägung der Zielgene in vGIPZ-Spe transduzierten Zellen. L-428- und KM-H2-Zellen wurden jeweils mit den Viren vGIPZ-Spe und vGIPZ-IκBα infiziert und nach 3 Tagen gemäß der GFP-Ausprägung durch FACS sortiert (links). 293-Zellen wurden jeweils mit den lentiviralen Plasmiden pGIPZ-SpeI und pGIPZ-Spe-A20 transfiziert, L-1236 und KM-H2-Zellen wurden jeweils mit den Lentiviren vGIPZ-Spe und vGIPZ-Spe-A20 infiziert. Diese so infizierten Zellen wurden gemeinsam mit den transfizierten 293-Zellen gemäß GFP-Ausprägung mittels FACS sortiert. Von diesen sortierten Zellgruppen wurden Protein-Lysate gewonnen, die durch *Western-Blot* auf die Ausprägung der entsprechenden Proteine überprüft wurden. Hierdurch konnte nachgewiesen werden, dass die durch den mit dem vGIPZ-Spe eingebrachten Gene nur in geringem Maße ausgeprägt werden.

Hiermit wurde gezeigt, dass die von den Lentiviren codierten Proteine nur in sehr geringem Maße ausgeprägt wurden. So zeigten sich erst nach sehr langer Expositionszeit schwache Signale in den entsprechend transduzierten Zelllinien. Dies war bei den Transduktionen mit dem Virus, der nur für GFP codiert, nicht der Fall. Aufgrund der schwachen Ausprägung der durch den Lentivirus codierten Proteine wurde ein weiteres lentivirales Ausprägungs-Plasmid (pGIPZ-NheI) entworfen. In diesem wurde die Reihenfolge der auf dem Konstrukt befindlichen Gene GFP und TNFAIP3 bzw. NFKBIA^{S32,36A} getauscht, so dass in diesem Fall GFP hinter die IRES-Sequenz gesetzt wurde.

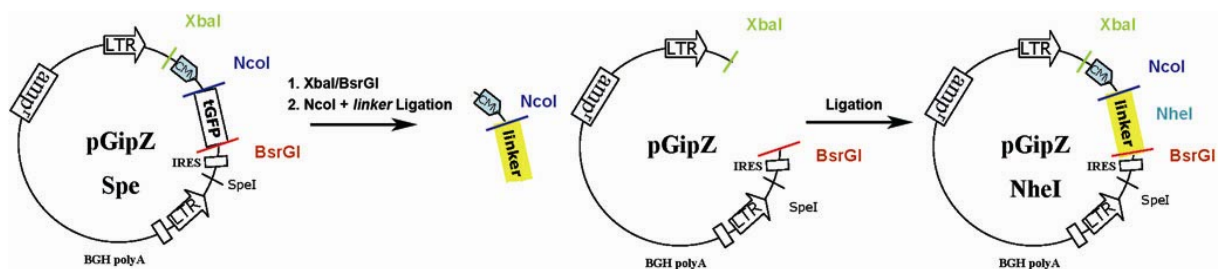


Abbildung 23: Erzeugung des lentiviralen Ausprägungs-Plasmids pGIPZ-NheI aus pGIPZ-SpeI. Im ersten Schritt wurde durch gleichzeitige XbaI- und BsrGI-Spaltung die Plasmid-Sequenz 5' des CMV-Promotors (XbaI) und im Stopp-Codon (BsrGI) des tGFP-Gens gespalten. Das entstandene Fragment wurde in der Folge mit NcoI gespalten, dessen Schnittstelle in diesem Fragment einmalig im Start-Codon des tGFP-Gens lag. Das Fragment, das den Promotor enthielt, wurde anschließend gemeinsam mit dem erzeugten Plasmid-Rückgrat und mit einem doppelsträngigen Linker-Oligonukleotid, das eine NheI-Stelle und überhängende Enden komplementär zu NcoI und BsrGI besaß ligiert und transformiert.

In den so erzeugten Produkten entstand demgemäß ein polycistronisches Transkript, welches initiiert vom CMV-Promoter die codierenden Sequenzen für A20 oder IκBα^{S32,36A}, die IRES-Sequenz und dahinter die GFP-Gensequenz enthielt. Die Insertion der entsprechenden Gene geschah aus dem pGIPZ-SpeI Konstrukt. Nach

der Virusproduktion zeigten sich mit diesen Konstrukten im Vergleich zu vGIPZ-SpeI über 20xfach niedrigere Titer für die Konstrukte, in denen die Gene codierend für I κ B α und A20 enthalten waren. Der Virus, der nur für GFP codiert hatte, wies vergleichbare Titer auf. Des Weiteren wurden deutlich schwächere GFP-Signale im FACS beobachtet.

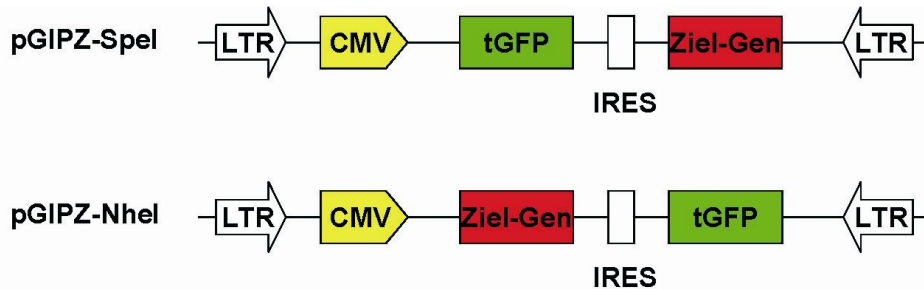


Abbildung 24: Schematische Darstellung des durch die Lentiviren in das Wirtsgenom inserierten DNA-Abschnitts.

Um die Ausprägungsstärke der verschiedenen im Lauf der vorliegenden Arbeit erzeugten Konstrukte zu testen, wurden 293-Zellen mit den Konstrukten vGIPZ-SpeI-Luc, vGIPZ-NheI-Luc und pRTS-Luc transduziert bzw. transfiziert und gemäß der entsprechenden Reportern-Genausprägung mittels Durchflusscytometrie jeweils 5×10^5 Zellen sortiert.

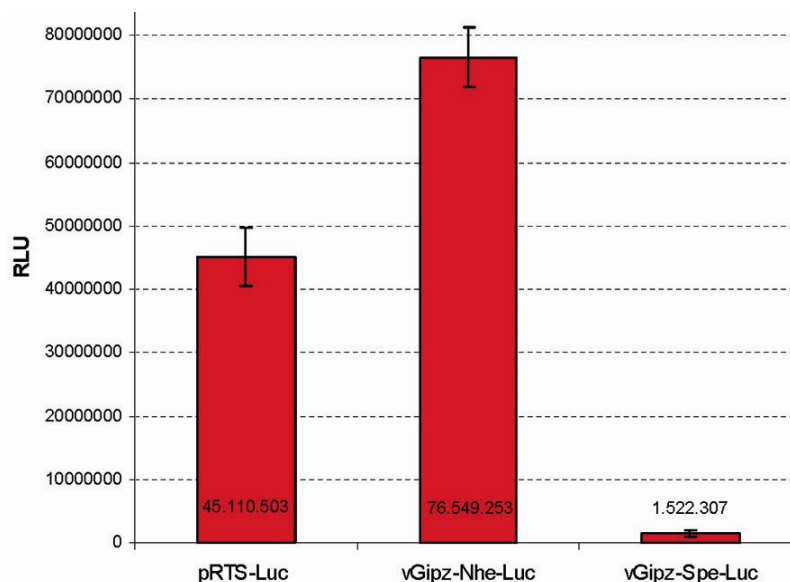


Abbildung 25: Unterschiedliche Ausprägungsstärken der erzeugten Konstrukte. 293-Zellen wurden mit dem pRTS-Luc, vGIPZ-Nhe-Luc und vGIPZ-Spe-Luc transfiziert bzw. transduziert. 3 Tage nach Induktion bzw. Transduktion wurden diese Zellen gemäß der Marker-Ausprägung der verschiedenen Konstrukte durch FACS in gleichen Zellmengen sortiert und auf Luciferase-Ausprägung untersucht. So wurde nachgewiesen, dass der vGIPZ-Spe eine etwa 50fach schwächere Ausprägung des eingebrachten Zielgens zeigt.

Ebenso wurde dies mit Zellen, die mit den Konstrukten vGIPZ-SpeI, vGIPZ-NheI und pRTS-I κ B α transduziert bzw. transfiziert waren, durchgeführt. Von diesen Zellen wurden jeweils Luziferase Untersuchungen durchgeführt und ausgewertet (Abbildung 25). Dabei wurden die ermittelten Lumineszenz-Werte der Luc-ausprägenden Zellen mit den Werten der Zellen, in die entsprechende Konstrukte eingebracht wurden, die das Luc-Gen nicht beinhalteten, normalisiert.

Auf diese Weise wurde ersichtlich, dass das zuletzt erzeugte Konstrukt (GIPZ-NheI) eine etwa 50 fache Ausprägungsstärke des Zielgens im Vergleich zu der GIPZ-Spe-Variante besitzt, dies allerdings auf Kosten eines wesentlich erniedrigten Titers. Die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich in der schwächeren GFP-Ausprägung in den durch vGIPZ-NheI-infizierten Zellen.

In der Folge wurde 293-Zellen mit den Lentiviren vGIPZ-NheI-I κ B α und vGIPZ-NheI-A20 infiziert, mittels GFP-Ausprägung durchflusszytometrisch sortiert und auf Ausprägung der entsprechenden Proteine durch *Western-Blot* untersucht. Erwartungsgemäß zeigte sich eine starke Ausprägung der entsprechenden Proteine. Der Vergleich der durch den vGIPZ-NheI-A20 bedingten Ausprägung von A20 in 293-Zellen mit der A20-Protein-Ausprägung in unbehandelten L-428 HL-Zellen zeigte des Weiteren, dass die lentiviral-vermittelte A20-Ausprägung etwa 1,5-2 fach stärker ist als die endogene A20-Ausprägung in der L-428.

Zur Infektion der HL-Zelllinien wurde der GIPZ-Nhe-Virus in der Folge mittels Ultrazentrifugation konzentriert. Hiermit lies sich eine Steigerung des Titers um etwa die zehnfache Menge erreichen. Mit diesen konzentrierte Viren wurden die HL-Linien L-428, L-1236 und KMH2 erneut infiziert, 1.000-2.500 GFP-ausprägende Zellen sortiert und auf die differentielle Ausprägung der beschriebenen NF- κ B-Zielgene untersucht.

Hierdurch ließen sich in der KM-H2 und der L-1236 sowohl durch die Ausprägung des I κ B α ^{S32,36A}-Proteins als auch durch Ausprägung von A20 niedrigere Transkriptionsraten der NF- κ B-Zielgene beobachten (Abbildung 26). Diese transkriptionellen Unterschiede wurden durch den Vergleich der Ausprägungsstärke der NF- κ B-Zielgene in den mit den NF- κ B-Inhibitoren transduzierten Zellen mit der Ausprägungsstärke der NF- κ B-Zielgene in den ausschließlich mit den GFP transduzierten Zellen ermittelt ($\Delta\Delta$ Ct-Methode).

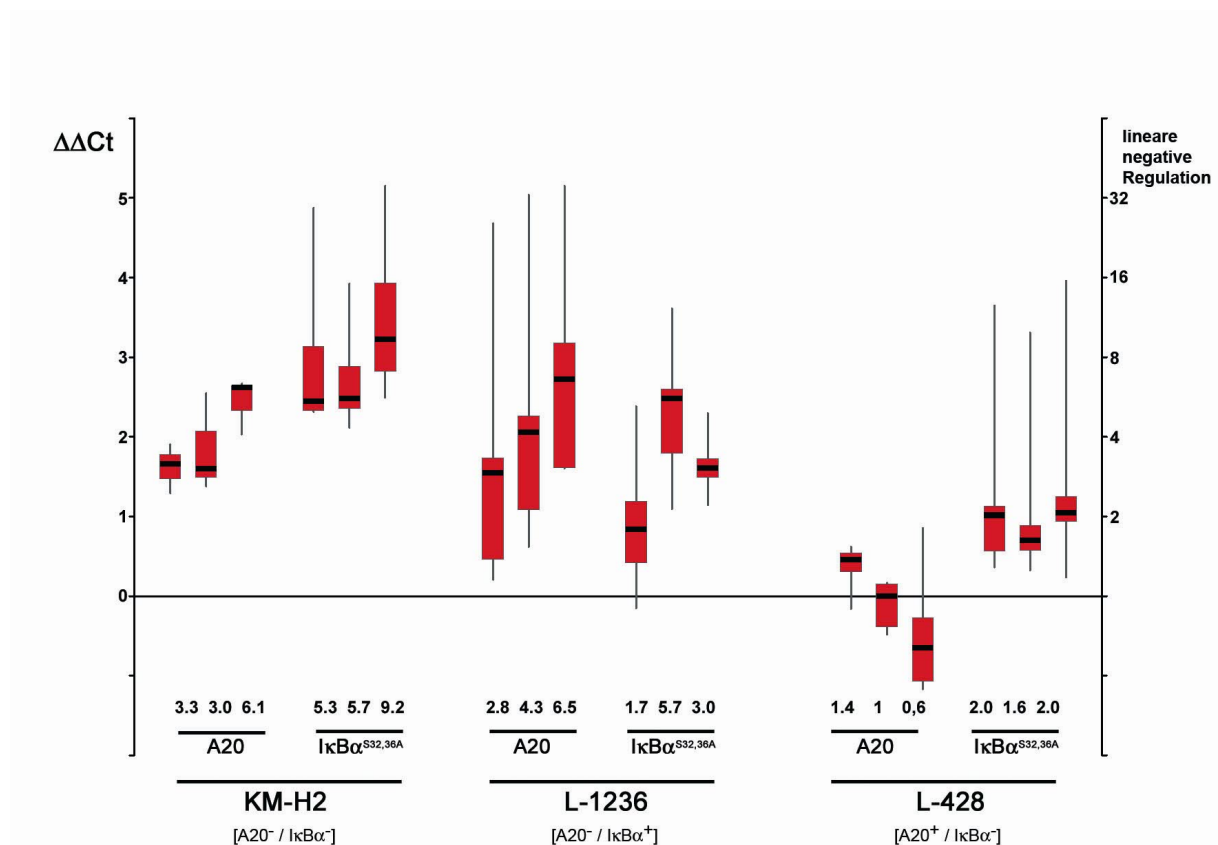


Abbildung 26: Reduktion transkriptioneller NFκB-Aktivität in HL-Zelllinien durch Ausprägung von A20 und IκBα^{S32,36A}. Die Zelllinien KM-H2, L-1236 und 428 wurden jeweils mit den Lentiviren vGIPZ-Nhe-A20 bzw. vGIPZ-Nhe-IκBα^{S32,36A} infiziert und nach 3 Tagen mittels GFP-Ausprägung sortiert. Von diesen sortierten Zellen wurde eine qPCR auf die NFκB-Zielgene BIRC3, ICAM1 und LTA durchgeführt. Mit Hilfe des Vergleichs der Ausprägungsstärke dieser NFκB-Zielgene aus den entsprechenden Zelllinien, die mit vGIPZ-Nhe infiziert wurden, wurde eine negative transkriptionelle Regulation von NFκB nach Ausprägung von A20 und IκBα^{S32,36A} ermittelt (ΔΔ Ct-Methode). Es zeigt sich, dass NFκB durch die Wiederherstellung von A20 in den mutierten Zelllinien KM-H2 und L-1236 in vergleichbarem Maße negativ reguliert wird, wie dies durch die Ausprägung des IκBα^{S32,36A} der Fall ist. Dieser Effekt lässt sich in der Zelllinie L-428, die stark Wildtyp-A20-Protein ausprägt, nicht beobachten. Da in früheren Studien die durch Ausprägung des IκBα^{S32,36A} vermittelte Inhibition von NFκB zum Zelltod von HL-Zelllinien führte, bestätigt dieses Ergebnis die funktionelle Beteiligung der A20-Inaktivierung in HL-Zelllinien an der konstitutiven NFκB-Aktivität.

Der Median der erniedrigten linearen Transkriptionsraten für die NF-κB-Zielgene BIRC3, ICAM1 und LTA lag infolge des TNFAIP3-Gentransfers zwischen 3-6,1 in der KM-H2 und 2,8-6,5 in der L-1236. Im Vergleich dazu lag der Median der erniedrigten linearen Transkriptionsraten bedingt durch NFKBIA^{S32,36A}-Gentransfer in der KM-H2 bei 5,3-9,2 und in der L-1236 bei 1,7-3,0. Dieses vergleichbare Ausmaß negativer transkriptioneller NF-κB-Regulation infolge der durchgeführten A20-Ausprägung und infolge der durchgeführten IκBα^{S32,36A}-Ausprägung lässt darauf schließen, dass die Inaktivierung von A20 in diesen Zellen zur konstitutiven NF-κB-Aktivität beiträgt. Interessanterweise sind in KM-H2-Zellen sowohl TNFAIP3 als auch NFKBIA durch Mutationen inaktiviert. In dieser Zelllinie ließ sich jeweils durch Ausprägung einer der beiden NF-κB-Inhibitoren ein vergleichbarer starker negativer Effekt transkriptioneller NF-κB-Aktivität beobachten.

Im Gegensatz zu den mit der L-1236- und KM-H2-Linie ermittelten vergleichbaren Ergebnissen infolge der A20- und $\text{I}\kappa\text{B}\alpha^{\text{S32,36A}}$ -Ausprägung, konnte ein konsistent negativer Effekt auf die Transkription der NF- κB -Zielgene in der L-428 nur durch Ausprägung des $\text{I}\kappa\text{B}\alpha^{\text{S32,36A}}$ -Proteins beobachtet werden. Diese Zelllinie trägt ebenso wie die KM-H2 inaktivierende NFKBIA-Mutationen, prägt jedoch das Wild-Typ-A20-Protein stark aus. Dies zeigt, dass die durch den lentiviralen Gentransfer ermittelte 1,5-2 stärkere A20-Ausprägung im Vergleich zur endogenen A20-Ausprägung in dieser Linie keinen Effekt auf die transkriptionelle NF- κB -Aktivität hat und bestätigt des Weiteren, dass inaktivierende TNFAIP3-Mutationen einen Beitrag zur konstituiven NF- κB Aktivität leisten.

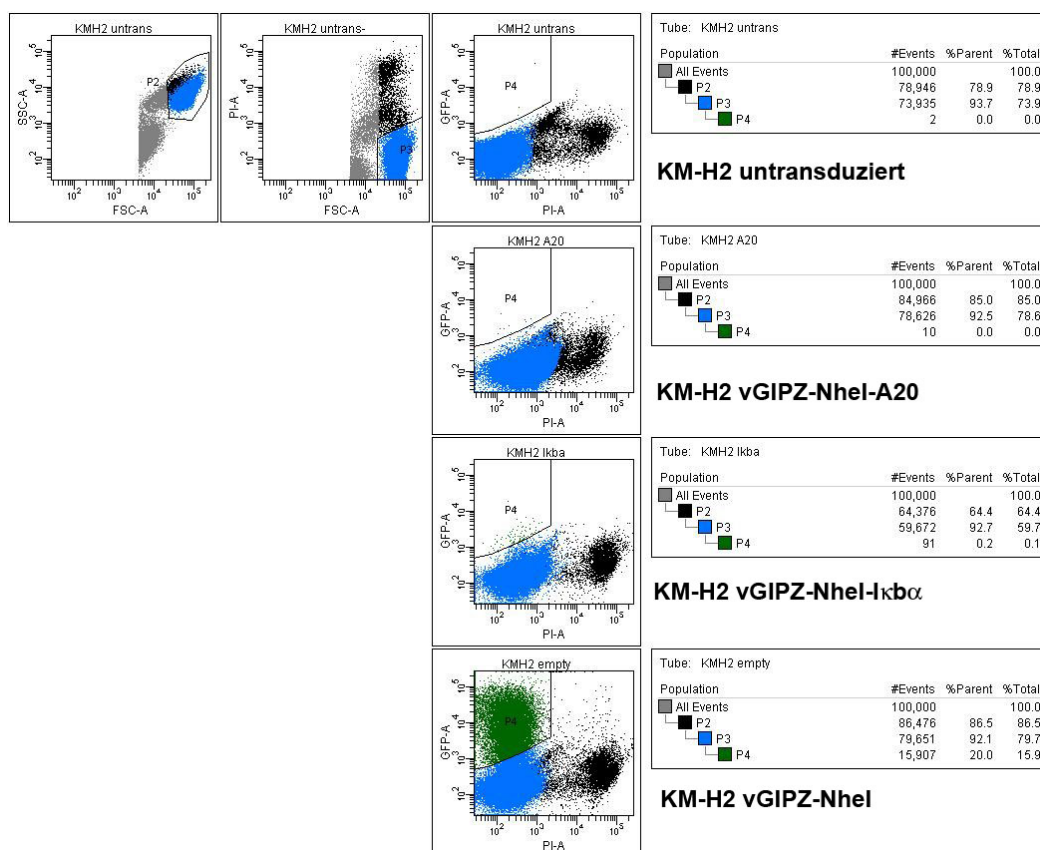


Abbildung 27: FACS-Sortierung der mit den vGIPZ-NheI infizierten Zelllinien. Dargestellt ist die durchflusszytometrische Analyse von mit den drei unterschiedlichen Viren transduzierten KM-H2-Zellen. Während die mit den vGIPZ-NheI infizierten Zellen eine große Anzahl stark GFP-ausprägender Zellen aufweisen (unten), lässt sich in den Transduktionen mit den Viren vGIPZ-NheI-A20 und vGIPZ-NheI- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ nur eine geringe Anzahl schwach GFP-positiver Zellen erkennen. Dies ist besonders ausgeprägt im Falle der Transduktionen mit vGIPZ-NheI-A20. Diese schwache GFP-Ausprägung und die damit verbundenen Schwierigkeiten der Sortierung könnten eine mögliche Ursache für die stark schwankenden Ausprägungsstärken der NF- κB -Zielgene sein.

In den pro Zelllinie und Konstrukt jeweils vierfach durchgeführten Untersuchungen ließen sich zwischen den Experimenten hohe Schwankungen der erniedrigten NF- κ B-Zielgen-Transkription beobachten. Die Ursache liegt vermutlich darin, dass bedingt durch schwache GFP-Fluoreszenz-Signale die Sortierung durch FACS erschwert war. In einigen dieser Sortierungen sind so aufgrund geringer Transduktionseffizienzen vermutlich in unterschiedlichem Ausmaß in den TNFAIP3- und NFKBIA-Transduktionen auch nicht-transduzierte, autofluoreszierende Zellen sortiert worden (Abbildung 27).

Die hier vorgestellten Ergebnisse der Inaktivierung des TNFAIP3-Gens durch Mutationen in HL und PMBL und die funktionellen Hinweise in HL-Zelllinien auf eine Beteiligung dieser Mutationen an der konstituiven NF- κ B-Aktivität deuten stark auf eine Tumorsuppressorgen-Rolle für TNFAIP3 in diesen Lymphomen hin.

4. Diskussion

4.1. Molekulare Charakterisierung von Ig-assoziierten Translokationen im cHL

In etwa 20% aller HL lassen sich zytogenetisch in den HRS-Zellen Bruchpunkte in den Ig-Loci als Hinweis auf Ig-assoziierte Translokationen nachweisen (Martin-Subero et al. 2006). In der Mehrheit der Fälle finden sich diese Bruchpunkte in den IgH-Loci, während die Leichtketten-Loci nur selten involviert sind. Ferner lassen Interphase-zytogenetische Methoden Hinweise darauf erkennen, dass diese Bruchpunkte in den Switch-Regionen der IgH-Loci lokalisiert sind.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stellen die erste molekulare Bestätigung solcher Ig-assoziierten Translokationen in HRS-Zellen dar. Der Nachweis der Translokationsbruchpunkte in einer HL-Zelllinie und einem primären Fall in den Switch-Regionen der IgH-Loci legt die Vermutung nahe, dass diese Translokationen im Verlauf eines fehlerhaften Klassenwechsels im GC stattgefunden haben. Die Tatsache, dass in diesen Fällen jeweils zwei Switch-Regionen an der Fusion der beiden derivativen Chromosomen beteiligt sind, bestätigt diese Annahme. In einem der Fälle findet sich der Bruchpunkt im CIITA-Gen-Locus, wenige 100 Basenpaare flussabwärts der Promotoren. Da der CIITA-Gen-Locus ein Ziel aberranter Hypermutation ist, stellt dieser Befund ein weiteres Argument für die Hypothese dar, dass diese Translokationen durch AID-induzierte Doppelstrangbrüche im Verlauf der GC-Reaktion entstehen (Klein und Dalla-Favera 2008).

Die funktionelle Konsequenz dieser Ig-assoziierten Translokationen in HRS-Zellen ist noch wenig verstanden. HRS-Zellen zeichnen sich durch das Fehlen Ig-spezifischer Transkriptionsfaktoren sowie durch epigenetisch stillgelegte IgH-Loci aus (Re et al. 2001; Stein et al. 2001; Ushmorov et al. 2004). Eine verstärkte Ausprägung der in die IgH-Loci translozierten Gene, wie sie in zahlreichen NHL zu beobachten ist, erscheint daher unwahrscheinlich. Die in Abschnitt 3.2.1 erläuterte etwa gleichstarke Ausprägung des translozierten und nicht translozierten Allels des betroffenen BCL2-Gens in HRS-Zellen eines Kombinationslymphoms lässt jedoch darauf schließen, dass die Ausprägung der in Ig-Translokationen involvierten Gene in diesen Zellen nicht völlig unterdrückt ist (siehe unten). Demnach könnte ein Verlust der Regulation der Ausprägung der translozierten Gene durch den Verlust ihrer Promotoren zu einer konstitutiven Ausprägung dieser Gene führen. Des Weiteren könnte die pathogenetische Bedeutung einer fehlregulierten Ausprägung der in die

Ig-Loci translozierten Gene in einer frühen Phase der Entstehung von HRS-Zellen liegen. Die verstärkte oder fehlregulierte Ausprägung eines Gens infolge einer Ig-assoziierten Translokation in einer HRS-Vorläufer-Zelle im GC, deren Ig-Transkription noch nicht stillgelegt ist, könnte so an der Transformation maßgeblich beteiligt sein. Das gehäufte Auftreten von BCL6-Translokationen in ABC-DLBCL stützt diese Hypothese (Iqbal et al. 2006). BCL6-Ausprägung ist in dieser Untergruppe der DLBCL jedoch nicht nachzuweisen. Interessanterweise wurde in unserer Gruppe eine Ig-Switch-Region-assoziierte Translokation von BCL6 auch in einem Fall des HL molekular nachgewiesen. Wie für das HL typisch, findet sich in den HRS-Zellen dieses Lymphoms keine BCL6-Ausprägung.

Die Zuordnung eines Gens in der L-1236-Zelllinie, das in die Ig-assoziierte Translokation involviert ist, konnte bislang nicht gelingen. Die chromosomale Region 10q11 zeichnet sich durch hohe Komplexität und Reichtum an Heterochromatin aus (Guy et al. 2000; Deloukas et al. 2004), so dass in der bekannten Sequenz wenige 100 Basenpaare entfernt von den Bruchpunkten mehrere, ca. 150 Megabasen umfassende Lücken existieren. Infolgedessen konnten in diesem Bereich vermutlich bislang wenige Gene eindeutig annotiert werden.

HRS-Zellen in primären HL prägen eine Reihe von Cystein-Proteasen stark aus, darunter auch Cathepsin (E. Tiacci, persönliche Kommunikation). Die durch die RACE-PCR ermittelten Fusionstranskripte, bestehend aus Ig-Locus-Sequenz und einer Sequenz eines durch Homologievergleich klassifizierten Cathepsin L-ähnlichen Pseudogens, könnten ein Hinweis auf eine bislang unbekannte Funktion dieser Transkripte in der Entstehung des HL sein. Ob der beobachtete Verlust von ca. 800 kb an den Bruchpunkten der chromosomalen Region 10q11 eine Rolle in der Entstehung dieses HL spielt, lässt sich nicht klären. Verluste von chromosomalen Bereichen dieser Region sind bislang nur in seltenen Fällen der chronischen myeloiden Leukämie beschrieben (Gibas et al. 1987; Karrman et al. 2007). und Translokationen unter Beteiligung dieser Region in Tumoren hämatopoetischen Ursprungs nicht bekannt.

Die Analyse weiterer primärer HL auf Ig-assoziierte Translokationen und funktionelle Studien an der L-1236-Zelllinie sind folglich notwendig, um die Bedeutung dieser genetischen Läsionen in der Pathogenese des HL aufzuklären.

4.2 Gemeinsame und separate transformierende Ereignisse in klonal verwandten Kombinationslymphomen

Die Untersuchung seltener Fälle von Kombinationslymphomen bestehend aus HL und NHL bieten die einmalige Möglichkeit, Einblicke in die Mehrschritt-Pathogenese solcher Lymphome zu erlangen. IgH-assoziierte chromosomale Translokationen unter Beteiligung der BCL1- und BCL2-Genen sind ein Kennzeichen für MCL und FL (Küppers 2005). Beide Translokationen treten vermutlich während einer fehlerhafter VDJ-Umlagerung in der frühen B-Zell-Entwicklung auf, da die Translokationsbruchpunkte in der Nähe der Rekombination Signal Sequenzen (RSS) der Ig-JH-Gene liegen und oftmals die Anlagerung von N-Nukleotiden zeigen, ein charakteristisches Merkmal von VDJ-Umlagerung (Küppers und Dalla-Favera 2001).

Daher wurde der Frage nachgegangen, ob die MCL und FL der Kombinationslymphome die Ig-assoziierten BCL1- bzw. BCL2-Translokationen aufweisen würden, und wenn ja, ob HRS-Zellen der entsprechenden Fälle identische Translokationsbruchpunkte aufweisen. Durch Ermittlung der entsprechenden Ig-assoziierten Translokationen, zuerst mittels LDI-PCR in den NHL und daraufhin gezielt in den HL, konnte tatsächlich der Nachweis identischer Translokationsbruchpunkte in beiden Lymphomen der Kombinationslymphome erbracht werden. Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass die Translokationen bereits in den gemeinsamen Tumor-Vorläufern der drei Kombinationslymphome vorhanden waren, und stützt die Vermutung, dass diese Translokationen in den allermeisten Fällen während der VDJ-Umlagerung in der frühen B-Zell-Entwicklung aufgetreten sind.

In B-NHL werden die Onkogene, die in die Ig-assoziierten Translokationen involviert sind, durch die Kontrolle regulatorischer transkriptioneller Elemente des Ig-Locus konstitutiv stark ausgeprägt, was in diesen Fällen wahrscheinlich zur Pathogenese der Lymphome beiträgt. Demgemäß wurde in den FL und MCL der Kombinationslymphome BCL2- bzw. BCL1-Protein-Ausprägung beobachtet. HRS-Zellen hingegen haben die Ausprägung der meisten B-Zell-spezifischen Proteine wie z.B. den B-Zell-Rezeptor (BCR) und die für die Ig-Transkription entscheidenden Transkriptionsfaktoren Oct-2 und Bob-1 verloren (Re et al. 2001; Stein et al. 2001; Torlakovic et al. 2001). Ferner ist in HRS-Zellen die Ausprägung der Ig-Gene durch epigenetische Mechanismen gehemmt (Ushmorov et al. 2004). Daher war es in den HRS-Zellen nicht zu erwarten, die durch IgH-Enhancer verursachte Ausprägung von Genen vorzufinden, die in Ig-assoziierte Translokationen involviert sind. In Überein-

stimmung damit zeigten die HRS-Zellen von Fall 5 keine BCL-1-Protein-Ausprägung. Im Gegensatz dazu waren in Fall 1 beide Allele, das translozierte und das nicht-translozierte, in etwa gleicher Menge in den HRS-Zellen ausgeprägt, wie durch die Unterscheidung der allel-spezifischen Ausprägung mit Hilfe eines Polymorphismus gezeigt werden konnte.

Welche Rolle Ig-assoziierte BCL2-Translokationen in der Pathogenese dieses HL gespielt haben, lässt sich nur schwer beantworten, da bekannt ist, dass HRS-Zellen oftmals BCL2-Ausprägung zeigen, während BCL2-Translokationen im HL fehlen (Brousset et al. 1996; Gravel et al. 1998). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese Translokationen während früher Schritte der Lymphom-Entwicklung eine entscheidende Rolle gespielt haben, da normale GC-B-Zellen – die Vorläufer der HRS-Zellen – keine BCL2-Ausprägung aufweisen (MacLennan 1994; Klein et al. 2003). Die durch die IgH-Enhancer entstandene konstitutive BCL2-Ausprägung in diesem frühen Stadium der HL-Entwicklung hat daher wahrscheinlich zum Überleben der Lymphom-Vorläufer-Zellen beigetragen. Nach dem Erwerb weiterer transformierender Ereignisse, die zur Ausbildung des HRS-Phänotyps beigetragen haben, ist wahrscheinlich das zweite nicht in die Translokation involvierte BCL2-Allel hoch reguliert worden. Ob ein ähnliches Szenario auf die BCL1-Translokation in Fall 5 zutreffen könnte, ist unklar. Bemerkenswerterweise zeigen die meisten Fälle von HL im Vergleich zu normalen GC-B-Zellen starke Ausprägung von Cyclin E, von dem in Maus-Studien gezeigt werden konnte, dass es die Funktion von Cyclin D1 ersetzen kann (Geng et al. 2001; Garcia et al. 2003). Daher könnte die Ausprägung von Cyclin E im Verlauf der Entwicklung des HRS-Klons die Rolle von Cyclin D1 ersetzt haben.

Obwohl in etwa 10-20% des HL Mutationen im NFKBIA-Gen identifiziert werden konnten, wurden in keinem der Fälle diese Mutationen gefunden (Cabannes et al. 1999; Emmerich et al. 1999; Jungnickel et al. 2000). Das Fehlen von NFKBIA-Gen-Mutationen in der vorliegenden Studie könnte auf die relativ kleine Zahl der analysierten Fälle und die niedrige Frequenz dieser Mutationen zurückzuführen sein. Dies könnte jedoch auch bedeuten, dass – sofern NFKBIA-Mutationen frühe Ereignisse in der Entstehung des HL sind – diese Mutationen in einer HRS-Vorläuferzelle inkompatibel mit der Entwicklung eines B-NHL mit fehlender konstitutiver NF- κ B-Aktivität desselben Vorläufers sein könnten. Die Abwesenheit dieser Mutationen in Fall 6 könnte zu dem Befund der Abwesenheit von NFKBIA-Mutationen in

DLBCL passen. Jedoch konnte eine Einteilung dieses DLBCL mittels immunphänotypischer Methoden aus Materialgründen nicht durchgeführt werden.

Das Fehlen von FAS-Gen-Mutationen war möglicherweise nicht überraschend, da innerhalb der untersuchten Lymphome nur DLBCL häufige Mutationen in diesen Genen zeigten. Dies könnte jedoch ein weiterer Hinweis auf die seltene Assoziation von FAS-Gen-Mutationen und der Pathogenese des HL sein (Müschen et al. 2001; Maggio et al. 2003).

Ein bemerkenswertes Ergebnis der Untersuchung der transformierenden Ereignisse in den Kombinationslymphomen ist der Befund von zwei Basenaustausch-Mutationen im TP53-Gen ausschließlich in DLBCL-Zellen des Falls 6. Diese beiden Mutationen waren auf verschiedene Allele verteilt und wurden jeweils exakt an solchen Positionen im TP53-Gen identifiziert, die zuvor in aggressiven NHL als häufig mutiert beschrieben worden waren, was eine pathogenetische Rolle dieser Mutationen vermuten lässt (Ichikawa et al. 1992; Cho et al. 1994; Koduru et al. 1997). Das ausschließliche Auftreten der Mutationen in DLBCL lässt auf ein spätes transformierendes Ereignis schließen, das aller Wahrscheinlichkeit nach im GC stattgefunden hat, da gemeinsame und separate somatische IgV-Gen-Mutationen in HRS- ebenso wie in den DLBCL-Zellen im Vorfeld gezeigt werden konnten. Die TP53-Mutation könnte daher an der Entwicklung des DLBCL aus einer gemeinsamen Vorläufer-Zelle der beiden Lymphom-Klone mitgewirkt haben. Die transformierenden Ereignisse, die die Entwicklung des HL beeinflusst haben, waren in diesem Fall jedoch nicht zu identifizieren. Das die gemeinsame Vorläufer-Zelle der beiden Lymphome keine TP53-Mutation trug, kann als weiteres Indiz dafür betrachtet werden, dass TP53-Gen-Mutationen eine untergeordnete Rolle in der Pathogenese des HL spielen (Montesinos-Rongen et al. 1999; Küpper et al. 2001; Maggio et al. 2001).

Zusammenfassend stützt die vorliegende Untersuchung verschiedener Kombinationslymphome die These, dass die Entwicklung solcher Kombinationslymphome sowohl von frühen gemeinsamen als auch von separaten transformierenden Ereignissen gekennzeichnet ist, die zu einem späteren Zeitpunkt die Entwicklung verschiedener Lymphome beeinflussen.

Bemerkenswerterweise konnte in einer früheren Untersuchung des Falls 5 EBV in einem HRS-Zell-Subklon nachweisen werden (Tinguely et al. 2003). Zusammen mit dem hier beschriebenen gemeinsamen transformierenden Ereignis, der Ig-assoziierten BCL1-Translokation in beiden Lymphomen, können so zwei verschiedene transformierende Ereignisse in diesem Fall nachgewiesen werden (Abbildung 28).

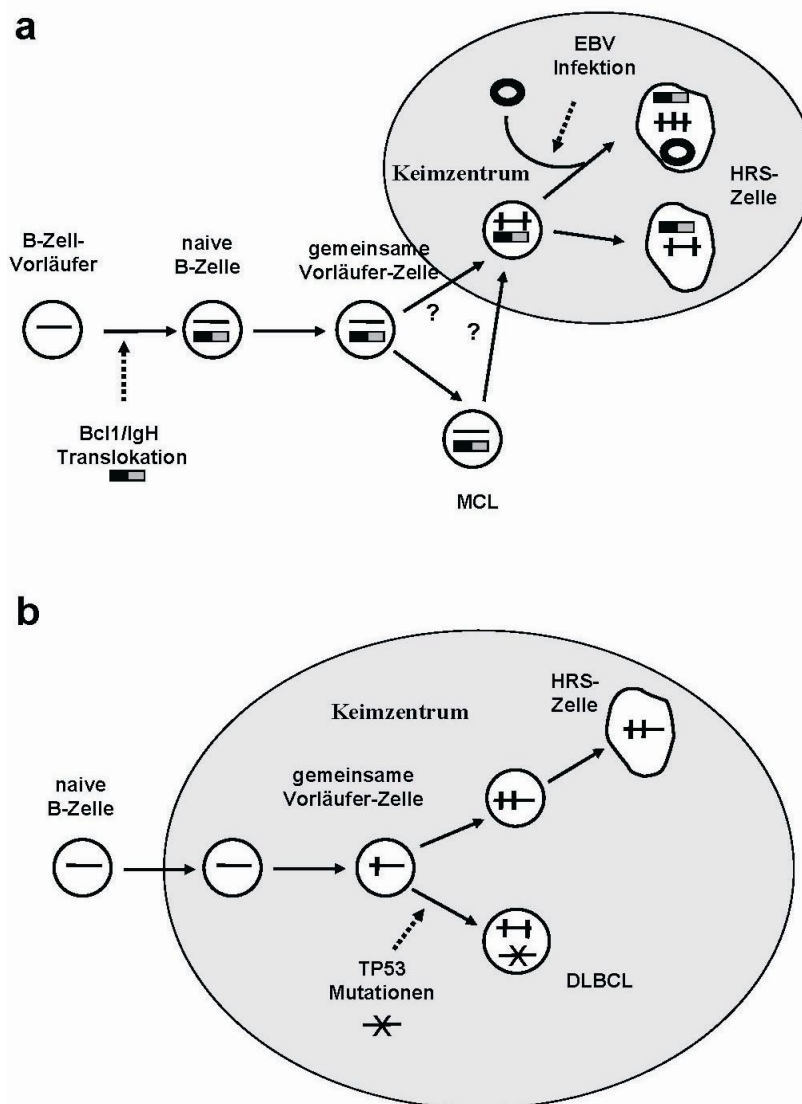


Abbildung 28: Entstehung klonal verwandter Kombinationslymphome. Abgebildet sind die Szenarien für die Kombinationslymphome bestehend aus HL und MCL des Falls 5 (a) sowie HL und DLBCL des Falls 6 (b). Die horizontalen Linien in den schematisierten Zellen verkörpern IgV-Gene, während die vertikalen Linien somatische Mutationen darstellen. **a:** Die dargestellte Ig-assoziierte BCL1-Translokation stellt ein frühes transformierendes Ereignis in der Entwicklung dieses Kombinationslymphoms dar. Ein weiteres transformierendes Ereignis in dieser gemeinsamen Vorläufer-Zelle hat vermutlich zur Teilung der Entwicklung der beiden Lymphome geführt. Im Fall der Entwicklung des HL war dies vermutlich die EBV-Infektion im Keimzentrum, die in einem Subklon der HRS-Zellen zu finden war. **b:** Das Beispiel des Kombinationslymphoms bestehend aus HL und DLBCL zeigt ein spätes transformierendes Ereignis im Keimzentrum, das vermutlich zur Entwicklung des DLBCL beigetragen hat.

4.3. Suche nach Tumorsuppressorgenen im HL und NHL

4.3.1 Mutationsanalyse des NFKBIA ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$)-Gens in *in vitro*-aktivierten B-Zell-ähnlichen DLBCL

Das Überleben und die Proliferation der Tumor-Zellen des ABC-DLBCL hängt von der konstitutiven NF- κ B-Aktivität in dieser Untergruppe des DLBCL ab (Davis et al. 2001). Dies gilt auch für das HL (Bargou et al. 1997; Hinz et al. 2001; Izban et al. 2001). Eine mechanistische Erklärung für diese konstitutive NF- κ B-Aktivität im HL lieferten in der Vergangenheit Befunde inaktivierender Mutationen im NFKBIA-Gen (Cabannes et al. 1999; Emmerich et al. 1999; Jungnickel et al. 2000; Hinz et al. 2002). Ausgehend von diesem Zusammenhang und dem Bericht einer inaktivierenden Mutation in einer DLBCL-Zelllinie wurden primäre Fälle des DLBCL auf Mutationen im NFKBIA-Gen untersucht.

Da die Möglichkeit einer zweifelsfreien Sub-Klassifizierung mittels genomweiter Ausprägungsstudien nicht zur Verfügung stand, wurden die zu untersuchenden DLBCL mittels der Protein-Ausprägung spezifischer Marker für GC-B-Zellen, wie BCL6 und CD10, und spezifischer Proteine für *in vitro*-aktivierte B-Zellen wie MUM1 untersucht. Dieser in zahlreichen Studien verwendete immunphänotypische Klassifikator wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Hans et al. 2004; Muris et al. 2006; Amen et al. 2007; Sjö et al. 2007). So wurde bislang nur in der Studie von Hans et al. die Korrelation zwischen dieser Marker-Konstellation und globaler Genausprägungs-Signatur untersucht. Alle anderen beziehen sich auf das Verhältnis zwischen dieser Marker-Ausprägung und der Überlebenswahrscheinlichkeit, die zwar mit den globalen Genausprägungs-Signaturen korreliert, aber nicht identisch ist. Aufgrund dieser möglichen Schwächen dieses Klassifikators kann die Unterteilung in ABC-DLBCL und GC-DLBCL nicht zweifelsfrei bestimmt werden.

Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Mutationsanalyse des NFKBIA-Gens auch solche Fälle untersucht, die sich nach Definition des Klassifikators als nicht-ABC-DLBCL einteilen lassen würden. Die Analyse zeigte jedoch nur einen Fall mit einer monoallelischen somatischen Mutation, bei dem beide Allele des NFKBIA-Gens in etwa ähnlichem Maße ausgeprägt werden. Der Aminosäureaustausch infolge dieser Mutation von Cystein zu Glycin in einer der Bindungsdomänen an den NF- κ B-Komplex könnte zu einem negativen Effekt auf die NF- κ B-Inhibition in diesem Fall führen. Jedoch ist nicht beschrieben, dass $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Proteine Multimere bilden, die

so zu einem dominant negativen Effekt dieser Mutation führen könnten. Da ferner das zweite nicht-mutierte Allel in gleichem Maße ausgesprägt scheint, bleibt die funktionelle Relevanz dieser Mutation ungeklärt. Einschränkend sollte jedoch erwähnt werden, dass nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden kann, dass ein Allel des Tumorklons verlorengegangen ist und die nachgewiesene somatische Mutation in einer Subpopulation des Tumorklons stattgefunden hat. In diesem Fall würde die Mutation jedoch kein primäres, an der Transformation der DLBCL-Vorläufer-Zelle beteiligtes Ereignis darstellen.

Die Definition des monoallelischen Basenaustausches an Position 287 des NFKBIA-Transkripts, die auch in Nicht-Tumorzellen zu finden ist, als Keimbahn-Mutation oder seltenen Polymorphismus ist nicht möglich. Der Austausch eines Prolin-Restes, der eine hydrophobe Aminosäure repräsentiert, gegen die hydrophile Aminosäure Serin könnte möglicherweise destabilisierend auf das I κ B α -Protein wirken. An der Aminosäure-Position 65 im I κ B α -Protein ist keine funktionelle Bedeutung bekannt.

Der Befund der Anwesenheit zweier Allele, ermittelt durch den Nachweis von monoallelischen Varianten, zumeist Polymorphismen, in allen Fällen spricht jedoch stark gegen eine Beteiligung von NFKBIA in der Pathogenese des ABC-DLBCL. In Übereinstimmung hiermit ließ sich keine Insertion oder Deletion des NFKBIA-Locus nachweisen. Diese Beobachtungen sprechen gegen eine biallelische Inaktivierung des NFKBIA-Gens, wie sie bei Tumorsuppressorgenen häufig zu beobachten ist. Ferner erscheint eine epigenetische Inaktivierung des NFKBIA-Gens unwahrscheinlich, da das NFKBIA-Gen ein direktes Zielgen transkriptioneller NF- κ B-Aktivität und damit Bestandteil der durch globale Genausprägungs-Untersuchungen ermittelten Ausprägungs-Signatur von ABC-DLBCL ist.

Ob die ermittelten, bislang unbekannten Polymorphismen eine genetische Prädisposition für das DLBCL darstellen, kann in dieser Studie aufgrund der kleinen Fallzahl und fehlender Kontrollpopulationen nicht beantwortet werden. Alle bekannten Polymorphismen treten häufig auf und sind daher wahrscheinlich nicht pathogenetisch relevant.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die ermittelten Allel-Verteilungsmuster und die niedrige Frequenz somatischer Mutationen bei gleichzeitiger Abwesenheit destruktiver Mutationen nicht auf eine Rolle von NFKBIA-Mutationen in der Pathogenese des ABC-DLBCL hinweisen. Bemerkenswerterweise konnten diese

Befunde in späteren Arbeiten an ABC-DLBCL, die mittels globaler Genausprägungsmethoden klassifiziert wurden, von anderen Gruppen bestätigt werden (Takahashi et al. 2006; Pasqualucci et al. 2008). In einer dieser Studien war auch die DLBCL-Subgruppe der PMBL untersucht worden, von denen ebenso gezeigt werden konnte, dass in diesen Lymphomen NFKBIA-Mutationen keine Rolle spielen.

Vor Kurzem wurden ABC-DLBCL-Mutationen in den Genen TNFAIP3 und CARD11 beschrieben, deren Genprodukte an der Regulation des NF- κ B-Signalwegs beteiligt sind (Lenz et al. 2008; Pasqualucci et al. 2008). Diese Befunde bestätigen die Annahme, dass andere transformierende Ereignisse an der Pathogenese des ABC-DLBCL beteiligt sind als NFKBIA-Mutationen.

4.3.2 Mutationsanalyse des BAD-Gens in HL und NHL

Die Regulation des mitochondrial-vermittelten Zelltods wird in Lymphozyten wesentlich durch Mitglieder der BCL2-Familie bestimmt. Mitglieder dieser Familie sind sowohl Zelltod-Antagonisten, wie z.B. BCL2 und BCLXL, als auch zelltodvermittelnde Faktoren, wie z.B. BAX, BAK, BIK und BAD (Marsden und Strasser 2003). Konformationsänderung und Oligomerisierung der pro-apoptotischen Proteine BAX und BAK führt in Folge eines apoptotischen Stimulus zur Freisetzung von Cytochrom c und zur Aktivierung einer Caspase-Signalkaskade, die in apoptotischen Zelltod mündet (Korsmeyer et al. 2000; Wei et al. 2001). Die anti-apoptotischen Faktoren BCL2 und BCLXL hingegen binden BAX und BAK und verhindern damit deren Aktivierung (Cheng et al. 2001). BAD ist ein direkter Antagonist dieses anti-apoptotischen Mechanismus und verdrängt BCL2 und BCLXL, was zu einer verstärkten Sensibilisierung der Zellen gegenüber der mitochondrial vermittelten Apoptose führt (Letai et al. 2002).

Maus-Modelle konnten in der Vergangenheit eindrucksvoll die Verbindung zwischen Lymphom-Pathogenese und dem BCL2-Familienmitglieder-regulierten Apoptose-Signalweg demonstrieren. So können in BCL2-transgenen Mäusen massive follikuläre Lymphoproliferation und erhöhte Überlebensraten BCL2-transgener B-Zellen *in vitro* beobachtet werden (McDonnell et al. 1989). Des Weiteren entwickeln Mäuse, die defizient für die pro-apoptotischen Proteine BIM und BID sind, Tumoren hämatopoetischen Ursprungs (Zinkel et al. 2003; Egle et al. 2004). BAD-defiziente Mäuse entwickeln trotz eines unauffälligen Phänotyps im Alter Lymphome, die sich scheinbar von GC-B-Zellen ableiten. Die pathogenetische Bedeutung der

Deregulation oder Inaktivierung von BCL2-Familienmitgliedern bei der Lymphom-Entstehung konnte wie beschrieben auch beim Menschen demonstriert werden (Meijerink et al. 1998; Gutierrez et al. 1999; Arena et al. 2003; Cimmino et al. 2005; Küppers 2005).

Auf dieser Grundlage wurden alle codierenden Exons des BAD-Gens von genomischer DNA der häufigsten B-Zell-Lymphome von insgesamt 74 Lymphomen sequenziert. Diese Auswahl enthielt demgemäß primäre FL-, MCL-, B-CLL-, DLBCL- und MALT-Lymphome und Zelllinien des DLBCL, HL, MM und BL. In keiner dieser Lymphome wurden Mutationen entdeckt. In den PCR-Produkten, die die Exons des BAD-Gens einfassten, befanden sich insgesamt drei Polymorphismen, die allerdings selten vorkommen und daher nur in wenigen Fällen auf die Anwesenheit eines zweiten BAD-Allels hinweisen konnten. Jedoch sind Verluste der chromosomalen Bande 11q13.1 selten in den untersuchten Lymphomen zu finden (Garcia et al. 2003; Schwaenen et al. 2004; Rubio-Moscardo et al. 2005; Tagawa et al. 2005). Dies steht in Übereinstimmung mit den durch Sequenzanalyse erzielten Ergebnissen und bestätigt die fehlende Assoziation von BAD-Mutationen und der Pathogenese von Lymphomen.

BAD-Protein-Expression ließ sich mittels *Western-Blot* in MCL, DLBCL, FL nachweisen, fehlt jedoch in MM und B-CLL (Kitada et al. 1998; Xerri et al. 1999; Spets et al. 2002). Ob in MM und B-CLL epigenetische Mechanismen für die fehlende BAD-Protein-Ausprägung verantwortlich sind, lässt sich in dieser Arbeit nicht beantworten.

In der Vergangenheit konnten in seltenen Fällen (4%) in Darm-Karzinomen inaktivierende Mutationen festgestellt werden, was auf eine pathogenetische Rolle von BAD in diesen Krebserkrankungen hinweisen könnte (Lee et al. 2004). Jedoch zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass BAD-Gen-Inaktivierung in Lymphomen keine Rolle spielt. Bemerkenswerterweise wurden die Ergebnisse dieser Arbeit unabhängig von dieser Studie wenig später bestätigt (Lee et al. 2006).

4.3.3 Mutationsanalyse der Gene CASP10, CASP8 und FADD im HL

Obwohl primäre HRS-Zellen und HL-Zelllinien den im extrinsischen Apoptose-Signalweg involvierten FAS-Rezeptor ausdrücken, sind HL-Zelllinien resistent gegen die Stimulation dieses Rezeptors (Re et al. 2000). In seltenen Fällen konnten inaktivierende Mutationen im FAS-Gen dafür verantwortlich gemacht werden

(Müschen et al. 2000a; Maggio et al. 2003). Ein weiterer Hinweis auf eine pathogenetische Bedeutung für Störungen des FAS-induzierten Signalweges im HL liefern Beobachtungen, dass Patienten des Autoimmunen-Lymphoproliferativen Syndroms (ALPS) ein 50-fach erhöhtes Risiko haben, an HL zu erkranken (Straus et al. 2001). ALPS ist eine Erbkrankheit, in der Keimbahnmutationen des FAS-Gens oder des CASP10-Gens identifiziert wurden (Fisher et al. 1995; Wang et al. 1999). Vor diesem Hintergrund wurden die Gene CASP8, CASP10 und FADD aus primären HRS-Zellen und HL-Zelllinien sequenziert, um eine mögliche Beteiligung von solchen Gen-Mutationen an der Pathogenese des HL zu klären.

Für die Sequenzanalyse der untersuchten Gene wurden die Exons 11,12, und 13 des CASP8-Gens ausgewählt, Exon 9 des CASP10-Gens und beide codierenden Exons des FADD-Gens. Diese Bereiche codieren für die Protease-Domänen der beiden Caspasen und des gesamten FADD-Proteins.

Der DISC besteht aus mehreren Monomeren der jeweiligen Proteine (Li-Weber und Krammer 2003). Heterozygote Mutationen in den Sequenzbereichen, die für die Caspase-Domänen codieren, hätten wahrscheinlich zur Folge, dass Monomere in den DISC rekrutiert werden, die sowohl vom Wildtyp- als auch vom mutierten Allel codiert werden. Die funktionellen Konsequenzen einer solchen Mutation, die die Zusammensetzung des DISC nicht beeinträchtigt, aber die Signal-Transduktion verhindert, würden sich dementsprechend dominant-negativ auswirken. Die Beobachtung, dass die meisten somatischen Mutationen im FAS-Gen, die in Lymphomen und Autoimmunerkrankungen beschrieben wurden, in der intrazellulären Todes-Domäne liegen, spricht für eine starke Selektion solcher Mutationen (Fisher et al. 1995; Martin et al. 1999; Müschen et al. 2002). Dementsprechend wurden in ALPS-Patienten heterozygote Mutationen im CASP10-Gen beschrieben, die gehäuft in Exon 9, das für die Protease-Domäne codiert, liegen (Fisher et al. 1995; Wang et al. 1999).

Jedoch wurden in keinem der 14 untersuchten HL-Fällen Mutationen in den Genen CASP8, CASP10 oder FADD in den HRS-Zellen beobachtet. Durch die Beobachtung heterozygot verteilter Polymorphismen in den Genen CASP8 und FADD konnten ferner Allelverluste für diese Gene in der Mehrzahl der Fälle ausgeschlossen werden. Wie durch *Western-Blot* Analysen einer Kooperationsgruppe gezeigt werden konnte, prägen die hier untersuchten Zelllinien die Gen-

produkte der drei untersuchten Gene stark aus, was eine z.B. epigenetisch-vermittelte Herunterregulation dieser Gene unwahrscheinlich macht.

Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass genetische Inaktivierung dieser Gene keine wesentliche Rolle bei der Apoptose-Resistenz von HRS-Zellen spielt und daher nicht an der Transformation von HRS-Vorläufer-Zellen beteiligt ist. Eine Erklärung für die FAS-vermittelte Apoptose-Resistenz von HL-Zelllinien könnte die starke Ausprägung des Caspase-Inhibitors c-FLIP sein (Thomas et al. 2002). FLIP ist in HRS-Zellen ein direktes Zielgen des NF- κ B Transkriptionsfaktorkomplexes (Hinz et al. 2002). Wie in späteren Studien funktionell gezeigt wurde, ist c-FLIP tatsächlich an der FAS-vermittelten Apoptose-Resistenz von HRS-Zellen beteiligt (Dutton et al. 2004; Mathas et al. 2004). Angesichts der geringen Frequenz von Mutationen in Genen, die in den FAS-vermittelten Apoptose-Signalweg involviert sind, wie FAS, CASP8, CASP10 und FADD, und der starken Ausprägung des Caspase-Inhibitors c-FLIP in HL scheinen solche Genmutationen daher keine Rolle in der Pathogenese des HL zu spielen. Dies unterstützt die zentrale Bedeutung der konstitutiven NF- κ B-Aktivität und des dadurch entstehenden antiapoptotischen Genausprägungsprogramms in der Entstehung und beim Überleben von HRS-Zellen. Diese Annahme wird ferner durch den Nachweis starker Ausprägung eines anderen antiapoptotischen Proteins in cHL, XIAP, dass ebenso ein Zielgen von NF- κ B ist, gestützt (Hinz et al. 2001; Kashkar et al. 2003).

4.3.4 Identifikation des TNFAIP3 (A20)-Gens als Tumorsuppressorgen im HL und PMBL

Das TNFAIP3-Gen liegt in der chromosomalen Bande 6q23. Zahlreiche zytogenetische Studien haben in der Vergangenheit zeigen können, dass in verschiedenen B-Zell-Lymphomen die chromosomalen Banden 6q21-23 wiederkehrend von monoallelischen Deletionen betroffen sind (Gaidano et al. 1992; Offit et al. 1994; Zhang et al. 1997; Zhang et al. 2000). Gemäß dem Knudsonschen Zwei-Treffer-Model zur Inaktivierung von Genen, die an der Entstehung von Tumoren beteiligt sind, war dies in der Vergangenheit Anlass vieler Studien zur Identifikation eines Tumorsuppressorgens in dieser Region (Knudson 1971; Offit et al. 1994; Zhang et al. 1997; Zhang et al. 2000). In etwa 25% der ABC-DLBCL konnte das in der chromosomalen Bande 6q21-22.1 gelegene PRDM1-Gen als ein mögliches Tumorsuppressorgen identifiziert

werden. PRDM1 codiert für Blimp-1, das an der terminalen Differenzierung von B-Zellen beteiligt ist (Pasqualucci et al. 2006; Tam et al. 2006).

Studien zu chromosomalen Verlusten in B-Zell-Lymphomen mit hochauflösenden genomweiten Methoden, wie z.B. *array*-basierte-vergleichende-Genom-Hybridisierung (*aCGH*) oder Einzel-Nukleotid-Polymorphismus (*SNP*)-chip, haben in der jüngsten Vergangenheit einen Bereich von minimalen gemeinsamen Verlusten in FL-, DLBCL- und MALT-Lymphomen sowie HL und PMBL definiert, in dem auch TNFAIP3 liegt (Kimm et al. 2007; Ross et al. 2007; Wessendorf et al. 2007; Giefing et al. 2008; Hartmann et al. 2008; Honma et al. 2008; Thelander et al. 2008).

Die Befunde der Mutationen und die Bestätigung der gleichzeitigen häufigen monoallelischen Deletionen durch die Sequenzanalysen und Interphase-Zytogenetik einer Kooperationsgruppe des TNFAIP3-Gens im HL und PMBL in der vorliegenden Arbeit weisen stark darauf hin, dass dieses Gen in der Tat ein Tumorsuppressorgen ist. Diese Hypothese wird weiter dadurch gestützt, dass auch in ca. 20% der ABC-DLBCL, die mittels genomweiter Ausprägungsstudien klassifiziert wurden, Mutationen des gleichen Musters gefunden werden können (Pasqualucci et al. 2008). In dieser Studie wurden ferner über 30 andere Gene, deren Genprodukte in die Regulation des NF- κ B-Signalweges involviert sind, untersucht. TNFAIP3 war dabei das Gen mit der höchsten Mutationsfrequenz. Fehlende Mutationen im TNFAIP3-Gen im DLBCL-Kollektiv dieser Arbeit könnten auf die relativ kleine Fallzahl und auf die Fehleranfälligkeit des immunphänotypischen Klassifikators zurückzuführen zu sein.

Das beschriebene Mutationsmuster des TNFAIP3-Gens im HL und PMBL weist stark auf eine Inaktivierung von A20 infolge der Mutationen hin. Dies wird gestützt durch den Befund fehlender Protein-Nachweisbarkeit in den Zelllinien mit Mutationen, die zu vorzeitigen Stopp-Codons führen. Ein immunhistochemischer Nachweis an primären Fällen ist bislang nicht möglich, da sich die verfügbaren Antikörper, die A20-Protein nachweisen, nicht für Gewebeschnitte eignen, wie von einer Kooperationsgruppe gezeigt werden konnte. Aufgrund der Nachweisbarkeit von TNFAIP3-mRNA in nahezu allen HL und den untersuchten Zelllinien, auch solchen, die vorzeitige Stopp-Codons enthalten, ist die Ausprägung verkürzter A20-Proteine zwar spekulativ, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden (Durkop et al. 2003). Die überwiegende Mehrzahl der Mutationen, die zu einem vorzeitigen Stopp-Codon führen, liegt N-terminal der A20-Zink-Finger. Da jedoch C-terminal verkürzte

A20-Proteine die Fähigkeit verloren haben, NF- κ B-Aktivität zu regulieren, erscheint eine funktionelle Inaktivierung durch die beobachteten Mutationen sehr wahrscheinlich (O'Reilly und Moynagh 2003).

Des Weiteren bestätigen die funktionellen Studien an HL-Zelllinien, dass Mutationen im TNFAIP3-Gen an der konstitutionellen NF- κ B-Aktivität im HL mitwirken. So konnte die deutliche Verringerung der transkriptionellen NF- κ B-Aktivität in den untersuchten Linien durch A20-Ausprägung nur in den Zelllinien beobachtet werden, in denen durch Mutationen kein A20-Protein nachweisbar war. Die Zelllinie L-428, die starke Ausprägung des A20-Wildtyp-Proteins zeigt, konnte mit der durch den lentiviralen Gentransfer experimentell erzielten Ausprägung von A20 nicht oder nur sehr schwach in ihrer transkriptionellen NF- κ B-Aktivität gehemmt werden.

Der somatische Ursprung der in den primären HL beobachteten Mutationen und das Vorhandensein in klonaler Form lassen auf die Selektion der Mutationen im Verlauf der Tumorentstehung schließen. Durch *SNP-chip*-Analysen einer Kooperationsgruppe konnte in der L-1236-Zelllinie ferner eine uniparentale Disomie (UPD) des mutierten TNFAIP3-Allels festgestellt werden. Dies bedeutet, dass die Mutation vor der Entstehung der UPD stattgefunden hat. Zusammen mit der Klonalität der Mutationen in den primären HL ist dies ein starker Hinweis auf ein primäres transformierendes Ereignis. Die beobachtete biallelische Inaktivierung, durch Deletionen oder Mutationen des zweiten Allels der Mehrzahl der Lymphome mit Mutationen, stützt ferner die Annahme einer Tumorsuppressorgen-Rolle für TNFAIP3. Dies wird weiter bestätigt durch kürzlich vorgestellte Arbeiten, die destruktive Mutationen auch im ABC-DLBCL und extranodalen MALT-Lymphomen zeigen konnten (Novak et al. 2008; Pasqualucci et al. 2008). Der Vergleich des TNFAIP3-Mutationsmusters in HL und PMBL mit den Mustern im ABC-DLBCL offenbarte verblüffende Übereinstimmung in der Lage der Mutationen, die zu vorzeitigen Stopp-Codons führen. Übertragen auf das A20-Protein liegen diese Mutationen in den untersuchten ABC-DLBCL wie in der vorliegenden Analyse in der Mehrzahl N-terminal gelegen der Zink-Finger. Dies stützt weiter die Annahme der pathogenetischen Bedeutung der beobachteten Mutationen.

Inaktivierende TNFAIP3-Mutationen wurden in den untersuchten Fällen ausschließlich in EBV-negativen HL identifiziert. Dies lässt auf sich komplementierende Funktionen der TNFAIP3-Inaktivierung und der EBV-Infektion in der Pathogenese

des HL schließen und unterstreicht ferner die pathogenetische Bedeutung von EBV im HL.

Die Bedeutung der monoallelischen Deletionen in der chromosomalen Bande 6q23 in Lymphomen ohne weitere Mutationen ist unklar. TNFAIP3 ist ein direktes Zielgen von NF- κ B (Hayden und Ghosh 2008). Daher ist es nicht erstaunlich, dass in allen HL-Fällen und Zelllinien mit Mutationen TNFAIP3-Transkripte nachgewiesen werden können. In der L-428, die ein TNFAIP3-Allel verloren hat, ist sehr starke A20-Protein-Ausprägung zu beobachten. Aus diesen Gründen erscheint der Verlust eines Allels in Lymphomen mit starker NF- κ B-Aktivität nicht zur A20-Inaktivierung auszureichen. Dies wird weiter bestätigt durch die Tatsache, dass Mäuse, die in der Keimbahn monoallelische Deletionen eines TNFAIP3-Allels tragen, keine pathologischen Anzeichen zeigen. A20-defiziente Mäuse, infolge der Inaktivierung beider Allele hingegen leiden unter schweren Entzündungen infolge nicht regulierbarer, TNF- α -induzierter NF- κ B-Signalantworten (Lee et al. 2000). Diese Mäuse sterben frühzeitig.

Einen interessanten Befund stellt die gleichzeitige Inaktivierung zweier an der Regulation des NF- κ B-Signalwegs involvierter Faktoren in der KM-H2-Zelllinie dar. So finden sich neben TNFAIP3-Mutationen auch NFKBIA-Mutationen in dieser Linie (Cabannes et al. 1999). Dies könnte auf unterschiedliche weitere Funktionen dieser beiden Faktoren in den Zellen hinweisen. Bestätigung findet dies in dem kürzlich veröffentlichten Befund einer Beteiligung von A20 an der Reduktion der Antigenpräsentation (Song et al. 2008). Bemerkenswerterweise finden sich in der L-428-Zelllinie ebenso inaktivierende Mutationen in Genen zweier Faktoren, I κ B α und I κ B ϵ , die an der Regulation des NF- κ B-Signalwegs beteiligt sind (Cabannes et al. 1999; Emmerich et al. 2003). Darüberhinausgehende Funktionen dieser beiden Faktoren sind jedoch bislang nicht beschrieben.

Durch den Nachweis von inaktivierenden Mutationen des TNFAIP3-Gens, häufig bei gleichzeitigem Verlust des zweiten Allels, und der funktionellen Beteiligung dieser Mutation an der konstitutiven NF- κ B-Aktivität in HL-Zelllinien konnte TNFAIP3 als Tumorsuppressorgen im HL und PMBL identifiziert werden.

Welche Rolle Verluste der chromosomalen Region 6q23 in anderen Lymphomen ohne konstitutive NF- κ B-Aktivität spielen, kann derzeit nicht beantwortet werden. In FL wurde in Studien ausgehend von den Befunden homozygoter Deletionen von TNFAIP3 dieses Gen in ca. 50 Fällen sequenziert. Mutationen in

TNFAIP3 wurden nicht beschrieben (Ross et al. 2007). Ferner zeigten eigene hier nicht dargelegte Untersuchungen die Abwesenheit von Mutationen auch in 12 untersuchten BL- und GC-DLBCL-Zelllinien. Dies bestätigt die Spezifität der TNFAIP3-Inaktivierung im HL, PBML und ABC-DLBCL. In NHL mit Deletionen des chromosomalen Bereichs 6q23 sind demnach vermutlich andere Tumorsuppressorgene in diesem Bereich an der Pathogenese beteiligt. Interessant sind in diesem Zusammenhang die Untersuchungen von Kombinationslymphomen aus HL und NHL, die jeweils beide Deletionen des chromosomalen Bereichs 6q23 aufweisen, sich aber vermutlich in der Inaktivierung der dort befindlichen Gene unterscheiden.

Weitere interessante Aufschlüsse über die Funktion der TNFAIP3-Inaktivierung ließen sich nach technischen Verbesserungen des Gentransfers dieses Gens in HL-Zelllinien und damit verbunden höheren Ausbeuten an Zellen, die die gewünschten Gene ausprägen, gewinnen.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnten wesentliche, neue Erkenntnisse über das Verständnis der Pathogenese des HL und NHL gesammelt werden. So wurden in zwei HL-Fällen Ig-assoziierte Translokationen molekular nachgewiesen. Die Bruchpunkte weisen dabei stark darauf hin, dass diese Translokationen im Verlauf der GC-Reaktion stattgefunden haben. Dies bestätigt ferner die seit der Aufklärung des B-Zell-Ursprungs angenommene Vermutung, dass diese Translokationen auch in HRS-Zellen des HL zu finden sind. Durch den Nachweis gemeinsamer und unterschiedlicher transformierender Ereignisse in klonal verwandten Kombinationslymphomen konnten Erkenntnisse in die Mehrschrittpathogenese dieser Lymphome gesammelt werden. Ferner ließen sich diese genetischen Läsionen zum Teil zeitlich in der Entstehung der einzelnen Lymphome zuordnen und bestätigen in manchen Fällen deren Entstehung im GC. Die Ausprägung beider BCL2-Allele in einem Fall, in dem beide Lymphome eine Ig-assoziierte Translokation aufweisen, ist darüber hinaus ein wichtiger Befund für die weitere Untersuchung von Ig-Translokationen in HRS-Zellen.

Durch die Demonstration der Abwesenheit inaktivierender NFKBIA-Mutationen, bei gleichzeitiger Anwesenheit beider Allele in DLBCL wurde gezeigt, dass, anders als in HRS-Zellen, Mutationen dieses Gens nicht an der konstitutiven NF- κ B-Aktivität beteiligt sind und bei der Pathogenese dieser Lymphome keine Rolle spielen. Ebenso konnte die durch Studien an Mäusen aufgeworfene Vermutung einer Tumorsuppressorgen-Rolle für das BAD-Gen in humanen Lymphomen durch die Abwesenheit von Mutationen in den häufigsten Lymphomentitäten widerlegt werden.

Im HL sind die Gene CASP8, CASP10 und FADD, die für Mitglieder des DISC codieren, nicht betroffen von Mutationen, die zu einem dominant-negativen Effekt führen und daher stark selektioniert würden. Aus diesem Grund erscheint auch hier die Rolle von Genmutationen in der Pathogenese des HL unwahrscheinlich.

In HRS-Zellen wurden gehäuft in EBV-negativen Fällen inaktivierende bi-allelische Mutationen des TNFAIP3-Gens identifiziert. Zusammen mit Hinweisen auf eine funktionelle Bedeutung dieser Mutationen an der konstitutiven NF- κ B-Aktivität in HL-Zelllinien stellt die A20-Inaktivierung ein transformierendes Ereignis dar, das an der Entstehung von HRS-Zellen beteiligt ist. Die Identifikation solcher Mutationen auch in PMBL zeigt an, dass TNFAIP3 auch in anderen Lymphomen ein Tumorsuppressorgen ist. Im HL ist die erläuterte A20-Inaktivierung das bislang häufigste beschriebene transformierende Ereignis.

6. Literatur

- Aiello, A., D. Delia, E. Fontanella, et al. (1990). Expression of differentiation and adhesion molecules in sporadic Burkitt's lymphoma. *Hematol Oncol* **8**(4): 229-38.
- Akasaka, H., T. Akasaka, M. Kurata, et al. (2000). Molecular anatomy of BCL6 translocations revealed by long-distance polymerase chain reaction-based assays. *Cancer Res* **60**(9): 2335-41.
- Akasaka, T., I. S. Lossos and R. Levy (2003). BCL6 gene translocation in follicular lymphoma: a harbinger of eventual transformation to diffuse aggressive lymphoma. *Blood* **102**(4): 1443-8.
- Alizadeh, A. A., M. B. Eisen, R. E. Davis, et al. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* **403**(6769): 503-11.
- Allen, C. D., T. Okada, H. L. Tang and J. G. Cyster (2007). Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science* **315**(5811): 528-31.
- Amen, F., D. Horncastle, K. Elderfield, et al. (2007). Absence of cyclin-D2 and Bcl-2 expression within the germinal centre type of diffuse large B-cell lymphoma identifies a very good prognostic subgroup of patients. *Histopathology* **51**(1): 70-9.
- Anagnostopoulos, I., H. Herbst, G. Niedobitek and H. Stein (1989). Demonstration of monoclonal EBV genomes in Hodgkin's disease and Ki-1-positive anaplastic large cell lymphoma by combined Southern blot and in situ hybridization. *Blood* **74**(2): 810-6.
- Arena, V., M. Martini, M. Luongo, et al. (2003). Mutations of the BIK gene in human peripheral B-cell lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer* **38**(1): 91-6.
- Bahler, D. W. and R. Levy (1992). Clonal evolution of a follicular lymphoma: evidence for antigen selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(15): 6770-4.
- Bai, M., A. Papoudou-Bai, N. Horianopoulos, et al. (2007). Expression of bcl2 family proteins and active caspase 3 in classical Hodgkin's lymphomas. *Hum Pathol* **38**(1): 103-13.
- Bargou, R. C., F. Emmerich, D. Krappmann, et al. (1997). Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest* **100**(12): 2961-9.
- Barth, T. F., J. I. Martin-Subero, S. Joos, et al. (2003). Gains of 2p involving the REL locus correlate with nuclear c-Rel protein accumulation in neoplastic cells of classical Hodgkin lymphoma. *Blood* **101**(9): 3681-6.
- Bechtel, D., J. Kurth, C. Unkel and R. Küppers (2005). Transformation of BCR-deficient germinal-center B cells by EBV supports a major role of the virus in the pathogenesis of Hodgkin and posttransplantation lymphomas. *Blood* **106**(13): 4345-50.
- Behm-Ansmant, I., I. Kashima, J. Rehwinkel, et al. (2007). mRNA quality control: an ancient machinery recognizes and degrades mRNAs with nonsense codons. *FEBS Lett* **581**(15): 2845-53.
- Bende, R. J., L. A. Smit and C. J. van Noesel (2007). Molecular pathways in follicular lymphoma. *Leukemia* **21**(1): 18-29.
- Berek, C., A. Berger and M. Apel (1991). Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* **67**(6): 1121-9.
- Boone, D. L., E. E. Turer, E. G. Lee, et al. (2004). The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol* **5**(10): 1052-60.
- Bornkamm, G. W., C. Berens, C. Kuklik-Roos, et al. (2005). Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic Acids Res* **33**(16): e137.
- Bottaro, A., F. Young, J. Chen, et al. (1998). Deletion of the IgH intronic enhancer and associated matrix-attachment regions decreases, but does not abolish, class switching at the mu locus. *Int Immunol* **10**(6): 799-806.
- Bräuninger, A., R. Küppers, J. G. Strickler, et al. (1997). Hodgkin and Reed-Sternberg cells in lymphocyte predominant Hodgkin disease represent clonal populations of germinal center-derived tumor B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(17): 9337-42.
- Bräuninger, A., R. Schmitz, D. Bechtel, et al. (2006). Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* **118**(8): 1853-61.
- Brousset, P., D. Benharroch, S. Krajewski, et al. (1996). Frequent expression of the cell death-inducing gene Bax in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Blood* **87**(6): 2470-5.
- Bryce, S. D., S. Lindsay, A. J. Gladstone, et al. (1994). A novel family of cathepsin L-like (CTSLL) sequences on human chromosome 10q and related transcripts. *Genomics* **24**(3): 568-76.
- Cabannes, E., G. Khan, F. Aillet, et al. (1999). Mutations in the IκBα gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for IκappaBalpha. *Oncogene* **18**(20): 3063-70.
- Caldwell, R. G., J. B. Wilson, S. J. Anderson and R. Longnecker (1998). Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity* **9**(3): 405-11.
- Calin, G. A., C. D. Dumitru, M. Shimizu, et al. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(24): 15524-9.
- Carbone, A., A. Gloghini, V. Gattei, et al. (1995a). Expression of functional CD40 antigen on Reed-Sternberg cells and Hodgkin's disease cell lines. *Blood* **85**(3): 780-9.
- Carbone, A., A. Gloghini, H. J. Gruss and A. Pinto (1995b). CD40 ligand is constitutively expressed in a subset of T cell lymphomas and on the microenvironmental reactive T cells of follicular lymphomas and Hodgkin's disease. *Am J Pathol* **147**(4): 912-22.
- Cario, G., U. Z. Stadt, A. Reiter, et al. (2000). Variant translocations in sporadic Burkitt's lymphoma detected in fresh tumour material: analysis of three cases. *Br J Haematol* **110**(3): 537-46.
- Chapman, C. J., C. I. Mockridge, M. Rowe, et al. (1995). Analysis of VH genes used by neoplastic B cells in endemic Burkitt's lymphoma shows somatic hypermutation and intraclonal heterogeneity. *Blood* **85**(8): 2176-81.

- Chaudhuri, J., M. Tian, C. Khuong, et al. (2003). Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. *Nature* **422**(6933): 726-30.
- Cheng, E. H., M. C. Wei, S. Weiler, et al. (2001). BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* **8**(3): 705-11.
- Cho, Y., S. Gorina, P. D. Jeffrey and N. P. Pavletich (1994). Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* **265**(5170): 346-55.
- Cimmino, A., G. A. Calin, M. Fabbri, et al. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(39): 13944-9.
- Colomo, L., A. Lopez-Guillermo, M. Perales, et al. (2003). Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **101**(1): 78-84.
- Damle, R. N., T. Wasil, F. Fais, et al. (1999). Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **94**(6): 1840-7.
- Davis, R. E., K. D. Brown, U. Siebenlist and L. M. Staudt (2001). Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med* **194**(12): 1861-74.
- Dean, F. B., J. R. Nelson, T. L. Giesler and R. S. Lasken (2001). Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res* **11**(6): 1095-9.
- Delabie, J., W. C. Chan, D. D. Weisenburger and C. De Wolf-Peeters (1995). The antigen-presenting cell function of Reed-Sternberg cells. *Leuk Lymphoma* **18**(1-2): 35-40.
- Deloukas, P., M. E. Earthrow, D. V. Grafham, et al. (2004). The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 10. *Nature* **429**(6990): 375-81.
- Di Noia, J. M. and M. S. Neuberger (2007). Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem* **76**: 1-22.
- Dorsett, Y., D. F. Robbiani, M. Jankovic, et al. (2007). A role for AID in chromosome translocations between c-myc and the IgH variable region. *J Exp Med* **204**(9): 2225-32.
- Drexler, H. G. (1993). Recent results on the biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. II. Continuous cell lines. *Leuk Lymphoma* **9**(1-2): 1-25.
- Durkop, H., B. Hirsch, C. Hahn, et al. (2003). Differential expression and function of A20 and TRAF1 in Hodgkin lymphoma and anaplastic large cell lymphoma and their induction by CD30 stimulation. *J Pathol* **200**(2): 229-39.
- Dutton, A., J. D. O'Neil, A. E. Milner, et al. (2004). Expression of the cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) protects Hodgkin's lymphoma cells from autonomous Fas-mediated death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(17): 6611-6.
- Ea, C. K., L. Deng, Z. P. Xia, et al. (2006). Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell* **22**(2): 245-57.
- Egle, A., A. W. Harris, P. Bouillet and S. Cory (2004). Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(16): 6164-9.
- Ellis, P. A., D. N. Hart, B. M. Colls, et al. (1992). Hodgkin's cells express a novel pattern of adhesion molecules. *Clin Exp Immunol* **90**(1): 117-23.
- Emmerich, F., M. Meiser, M. Hummel, et al. (1999). Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of NF-kappaB activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells. *Blood* **94**(9): 3129-34.
- Emmerich, F., S. Theurich, M. Hummel, et al. (2003). Inactivating I kappa B epsilon mutations in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *J Pathol* **201**(3): 413-20.
- Falini, B., M. Fizzotti, A. Pucciarini, et al. (2000). A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. *Blood* **95**(6): 2084-92.
- Fenton, J. A., G. Pratt, D. G. Rothwell, et al. (2004). Translocation t(11;14) in multiple myeloma: Analysis of translocation breakpoints on der(11) and der(14) chromosomes suggests complex molecular mechanisms of recombination. *Genes Chromosomes Cancer* **39**(2): 151-5.
- Fenton, J. A., J. W. Vaandrager, W. M. Aarts, et al. (2002). Follicular lymphoma with a novel t(14;18) breakpoint involving the immunoglobulin heavy chain switch mu region indicates an origin from germinal center B cells. *Blood* **99**(2): 716-8.
- Feuerborn, A., C. Moritz, F. Von Bonin, et al. (2006). Dysfunctional p53 deletion mutants in cell lines derived from Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* **47**(9): 1932-40.
- Feuerhake, F., J. L. Kutok, S. Monti, et al. (2005). NFkappaB activity, function, and target-gene signatures in primary mediastinal large B-cell lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma subtypes. *Blood* **106**(4): 1392-9.
- Feuillard, J., D. Taylor, M. Casamayor-Palleja, et al. (1995). Isolation and characteristics of tonsil centroblasts with reference to Ig class switching. *Int Immunol* **7**(1): 121-30.
- Fisher, G. H., F. J. Rosenberg, S. E. Straus, et al. (1995). Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* **81**(6): 935-46.
- Fisher, R. I. (2003). Overview of non-Hodgkin's lymphoma: biology, staging, and treatment. *Semin Oncol* **30**(2 Suppl 4): 3-9.
- Fiumara, P., V. Snell, Y. Li, et al. (2001). Functional expression of receptor activator of nuclear factor kappaB in Hodgkin disease cell lines. *Blood* **98**(9): 2784-90.
- Foss, H. D., R. Reusch, G. Demel, et al. (1999). Frequent expression of the B-cell-specific activator protein in Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease provides further evidence for its B-cell origin. *Blood* **94**(9): 3108-13.
- Fuchs, M., V. Diehl and D. Re (2006). Current strategies and new approaches in the treatment of Hodgkin's lymphoma. *Pathobiology* **73**(3): 126-40.
- Fukita, Y., H. Jacobs and K. Rajewsky (1998). Somatic hypermutation in the heavy chain locus correlates with transcription. *Immunity* **9**(1): 105-14.
- Gaidano, G., P. Ballerini, J. Z. Gong, et al. (1991). p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(12): 5413-7.
- Gaidano, G., R. S. Hauptschein, N. Z. Parsa, et al. (1992). Deletions involving two distinct regions of 6q in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* **80**(7): 1781-7.

- Garcia, J. F., F. I. Camacho, M. Morente, et al. (2003). Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: analyses using tissue microarrays. *Blood* **101**(2): 681-9.
- Garcia, J. L., J. M. Hernandez, N. C. Gutierrez, et al. (2003). Abnormalities on 1q and 7q are associated with poor outcome in sporadic Burkitt's lymphoma. A cytogenetic and comparative genomic hybridization study. *Leukemia* **17**(10): 2016-24.
- Gasparini, P., G. Sozzi and M. A. Pierotti (2007). The role of chromosomal alterations in human cancer development. *J Cell Biochem* **102**(2): 320-31.
- Gellert, M. (2002). V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu Rev Biochem* **71**: 101-32.
- Geng, Y., Q. Yu, W. Whoriskey, et al. (2001). Expression of cyclins E1 and E2 during mouse development and in neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(23): 13138-43.
- Gibas, L., L. Jackson and F. M. Fellin (1987). A case of chronic myelogenous leukemia with four Philadelphia chromosomes. *Cancer Genet Cytogenet* **28**(1): 179-80.
- Giefing, M., J. Arnemann, J. Martin-Subero, et al. (2008). Identification of candidate tumor suppressor gene loci for Hodgkin and Reed-Sternberg cells by characterization of homozygous deletions in classical Hodgkin lymphoma cell lines. *Br. J. Haematol.* **im Druck**.
- Gires, O., F. Kohlhuber, E. Kilger, et al. (1999). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *Embo J* **18**(11): 3064-73.
- Gires, O., U. Zimmer-Strobl, R. Gonnella, et al. (1997). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *Embo J* **16**(20): 6131-40.
- Gonzalez-Fernandez, F. (2003). Interphotoreceptor retinoid-binding protein--an old gene for new eyes. *Vision Res* **43**(28): 3021-36.
- Goossens, T., U. Klein and R. Küppers (1998). Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(5): 2463-8.
- Gordon, M. S., R. M. Kato, F. Lansigan, et al. (2000). Aberrant B cell receptor signaling from B29 (Igbeta, CD79b) gene mutations of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(10): 5504-9.
- Graninger, W. B., M. Seto, B. Boutain, et al. (1987). Expression of Bcl-2 and Bcl-2-Ig fusion transcripts in normal and neoplastic cells. *J Clin Invest* **80**(5): 1512-5.
- Gravel, S., G. Delsol and T. Al Saati (1998). Single-cell analysis of the t(14;18)(q32;q21) chromosomal translocation in Hodgkin's disease demonstrates the absence of this translocation in neoplastic Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Blood* **91**(8): 2866-74.
- Greiner, T. C., M. J. Moynihan, W. C. Chan, et al. (1996). p53 mutations in mantle cell lymphoma are associated with variant cytology and predict a poor prognosis. *Blood* **87**(10): 4302-10.
- Gronbaek, K., P. T. Straten, E. Ralfkiaer, et al. (1998). Somatic Fas mutations in non-Hodgkin's lymphoma: association with extranodal disease and autoimmunity. *Blood* **92**(9): 3018-24.
- Gumy-Pause, F., P. Wacker and A. P. Sappino (2004). ATM gene and lymphoid malignancies. *Leukemia* **18**(2): 238-42.
- Gutierrez, M. I., B. Cherney, A. Hussain, et al. (1999). Bax is frequently compromised in Burkitt's lymphomas with irreversible resistance to Fas-induced apoptosis. *Cancer Res* **59**(3): 696-703.
- Guy, J., C. Spalluto, A. McMurray, et al. (2000). Genomic sequence and transcriptional profile of the boundary between pericentromeric satellites and genes on human chromosome arm 10q. *Hum Mol Genet* **9**(13): 2029-42.
- Hans, C. P., D. D. Weisenburger, T. C. Greiner, et al. (2004). Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* **103**(1): 275-82.
- Hartmann, S., I. Martin-Subero, S. Gesk, et al. (2008). Detection of genomic imbalances in microdissected Hodgkin- and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma by array based comparative genomic hybridization. *Haematologica* **im Druck**.
- Hayden, M. S. and S. Ghosh (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* **132**(3): 344-62.
- Hinz, M., P. Lemke, I. Anagnostopoulos, et al. (2002). Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity. *J Exp Med* **196**(5): 605-17.
- Hinz, M., P. Loser, S. Mathas, et al. (2001). Constitutive NF-kappaB maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* **97**(9): 2798-807.
- Hirsch, B., M. Hummel, S. Bentink, et al. (2008). CD30-induced signaling is absent in Hodgkin's cells but present in anaplastic large cell lymphoma cells. *Am J Pathol* **172**(2): 510-20.
- Hodgkin, T. (1832). On some morbid appearances of absorbent glands and spleen. *Med Chir Trans* **17**: 68-114.
- Holtick, U., M. Vockerodt, D. Pinkert, et al. (2005). STAT3 is essential for Hodgkin lymphoma cell proliferation and is a target of tyrphostin AG17 which confers sensitization for apoptosis. *Leukemia* **19**(6): 936-44.
- Honma, K., S. Tsuzuki, M. Nakagawa, et al. (2008). TNFAIP3 is the target gene of chromosome band 6q23.3-q24.1 loss in ocular adnexal marginal zone B cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* **47**(1): 1-7.
- Horie, R., T. Watanabe, Y. Morishita, et al. (2002). Ligand-independent signaling by overexpressed CD30 drives NF-kappaB activation in Hodgkin-Reed-Sternberg cells. *Oncogene* **21**(16): 2493-503.
- Hummel, M., S. Bentink, H. Berger, et al. (2006). A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med* **354**(23): 2419-30.
- Ichikawa, A., T. Hotta, N. Takagi, et al. (1992). Mutations of p53 gene and their relation to disease progression in B-cell lymphoma. *Blood* **79**(10): 2701-7.
- Iqbal, J., T. C. Greiner, K. Patel, et al. (2007). Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* **21**(11): 2332-43.
- Iqbal, J., V. T. Neppalli, G. Wright, et al. (2006). BCL2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* **24**(6): 961-8.

- Irsch, J., J. Wolf, H. Tesch, et al. (2001). Class switch recombination was specifically targeted to immunoglobulin (Ig)G4 or IgA in Hodgkin's disease-derived cell lines. *Br J Haematol* **113**(3): 785-93.
- Izban, K. F., M. Ergin, Q. Huang, et al. (2001). Characterization of NF-kappaB expression in Hodgkin's disease: inhibition of constitutively expressed NF-kappaB results in spontaneous caspase-independent apoptosis in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Mod Pathol* **14**(4): 297-310.
- Jacob, J., G. Kelsoe, K. Rajewsky and U. Weiss (1991). Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* **354**(6352): 389-92.
- Jaffe, E., N. Harris, H. Stein and V. JW (2001). WHO Classification of Tumors: Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press.
- Jain, V. K., J. G. Judde, E. E. Max and I. T. Magrath (1993). Variable IgH chain enhancer activity in Burkitt's lymphomas suggests an additional, direct mechanism of c-myc deregulation. *J Immunol* **150**(12): 5418-28.
- Jares, P., D. Colomer and E. Campo (2007). Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nat Rev Cancer* **7**(10): 750-62.
- Joos, S., M. Küpper, S. Ohl, et al. (2000). Genomic imbalances including amplification of the tyrosine kinase gene JAK2 in CD30+ Hodgkin cells. *Cancer Res* **60**(3): 549-52.
- Joos, S., C. K. Menz, G. Wrobel, et al. (2002). Classical Hodgkin lymphoma is characterized by recurrent copy number gains of the short arm of chromosome 2. *Blood* **99**(4): 1381-7.
- Joos, S., M. I. Otano-Joos, S. Ziegler, et al. (1996). Primary mediastinal (thymic) B-cell lymphoma is characterized by gains of chromosomal material including 9p and amplification of the REL gene. *Blood* **87**(4): 1571-8.
- Jundt, F., O. Acikgoz, S. H. Kwon, et al. (2008). Aberrant expression of Notch1 interferes with the B-lymphoid phenotype of neoplastic B cells in classical Hodgkin lymphoma. *Leukemia*.
- Jundt, F., I. Anagnostopoulos, R. Forster, et al. (2002). Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood* **99**(9): 3398-403.
- Jung, S., K. Rajewsky and A. Radbruch (1993). Shutdown of class switch recombination by deletion of a switch region control element. *Science* **259**(5097): 984-7.
- Jungnickel, B., A. Staratschek-Jox, A. Bräuninger, et al. (2000). Clonal deleterious mutations in the IkappaBalpha gene in the malignant cells in Hodgkin's lymphoma. *J Exp Med* **191**(2): 395-402.
- Juszczynski, P., J. Ouyang, S. Monti, et al. (2007). The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(32): 13134-9.
- Kalaitzidis, D., R. E. Davis, A. Rosenwald, et al. (2002). The human B-cell lymphoma cell line RC-K8 has multiple genetic alterations that dysregulate the Rel/NF-kappaB signal transduction pathway. *Oncogene* **21**(57): 8759-68.
- Kanzler, H., M. L. Hansmann, U. Kapp, et al. (1996b). Molecular single cell analysis demonstrates the derivation of a peripheral blood-derived cell line (L1236) from the Hodgkin/Reed-Sternberg cells of a Hodgkin's lymphoma patient. *Blood* **87**(8): 3429-36.
- Kanzler, H., R. Küppers, M. L. Hansmann and K. Rajewsky (1996a). Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med* **184**(4): 1495-505.
- Kapp, U., J. Wolf, M. Hummel, et al. (1993). Hodgkin's lymphoma-derived tissue serially transplanted into severe combined immunodeficient mice. *Blood* **82**(4): 1247-56.
- Kapp, U., W. C. Yeh, B. Patterson, et al. (1999). Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *J Exp Med* **189**(12): 1939-46.
- Karrman, K., B. Sallerfors, S. Lenhoff, et al. (2007). Cytogenetic evolution patterns in CML post-SCT. *Bone Marrow Transplant* **39**(3): 165-71.
- Kashkar, H., C. Haefs, H. Shin, et al. (2003). XIAP-mediated caspase inhibition in Hodgkin's lymphoma-derived B cells. *J Exp Med* **198**(2): 341-7.
- Kashkar, H., J. M. Seeger, A. Hombach, et al. (2006). XIAP targeting sensitizes Hodgkin lymphoma cells for cytolytic T-cell attack. *Blood* **108**(10): 3434-40.
- Kimm, L. R., R. J. deLeeuw, K. J. Savage, et al. (2007). Frequent occurrence of deletions in primary mediastinal B-cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* **46**(12): 1090-7.
- Kitada, S., J. Andersen, S. Akar, et al. (1998). Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood* **91**(9): 3379-89.
- Klein, U. and R. Dalla-Favera (2005). New insights into the phenotype and cell derivation of B cell chronic lymphocytic leukemia. *Curr Top Microbiol Immunol* **294**: 31-49.
- Klein, U. and R. Dalla-Favera (2008). Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* **8**(1): 22-33.
- Klein, U., Y. Tu, G. A. Stolovitzky, et al. (2003). Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(5): 2639-44.
- Klobeck, H. G., G. Combrato and H. G. Zachau (1987). N segment insertion and region-directed somatic hypermutation in a kappa gene of a t(2;8) chromosomal translocation. *Nucleic Acids Res* **15**(12): 4877-88.
- Knudson, A. G., Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**(4): 820-3.
- Koduru, P. R., K. Raju, V. Vadmal, et al. (1997). Correlation between mutation in P53, p53 expression, cytogenetics, histologic type, and survival in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* **90**(10): 4078-91.
- Korsmeyer, S. J., M. C. Wei, M. Saito, et al. (2000). Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* **7**(12): 1166-73.
- Krug, U., A. Ganser and H. P. Koeffler (2002). Tumor suppressor genes in normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene* **21**(21): 3475-95.
- Kube, D., U. Holtick, M. Vockerodt, et al. (2001). STAT3 is constitutively activated in Hodgkin cell lines. *Blood* **98**(3): 762-70.

- Kulwichit, W., R. H. Edwards, E. M. Davenport, et al. (1998). Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(20): 11963-8.
- Küpper, M., S. Joos, F. von Bonin, et al. (2001). MDM2 gene amplification and lack of p53 point mutations in Hodgkin and Reed-Sternberg cells: results from single-cell polymerase chain reaction and molecular cytogenetic studies. *Br J Haematol* **112**(3): 768-75.
- Küppers, R. (2005). Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* **5**(4): 251-62.
- Küppers, R. and R. Dalla-Favera (2001). Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* **20**(40): 5580-94.
- Küppers, R., K. Rajewsky, A. Bräuninger and M. L. Hansmann (1998). L&H cells in lymphocyte-predominant Hodgkin's disease. *N Engl J Med* **338**(11): 763-4; author reply 764-5.
- Küppers, R., K. Rajewsky, M. Zhao, et al. (1994). Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(23): 10962-6.
- Küppers, R., R. Schmitz, V. Distler, et al. (2005). Pathogenesis of Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol Suppl* **66**: 26-33.
- Küppers, R., M. Zhao, M. L. Hansmann and K. Rajewsky (1993). Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *Embo J* **12**(13): 4955-67.
- Kutok, J. L. and F. Wang (2006). Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol* **1**: 375-404.
- Kutz, H., G. Reisbach, U. Schultheiss and A. Kieser (2008). The c-Jun N-terminal kinase pathway is critical for cell transformation by the latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus. *Virology* **371**(2): 246-56.
- Lam, K. P., R. Kuhn and K. Rajewsky (1997). In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* **90**(6): 1073-83.
- Landgren, O. and N. E. Caporaso (2007). New aspects in descriptive, etiologic, and molecular epidemiology of Hodgkin's lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am* **21**(5): 825-40.
- Lebecque, S. G. and P. J. Gearhart (1990). Boundaries of somatic mutation in rearranged immunoglobulin genes: 5' boundary is near the promoter, and 3' boundary is approximately 1 kb from V(D)J gene. *J Exp Med* **172**(6): 1717-27.
- Lee, E. G., D. L. Boone, S. Chai, et al. (2000). Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science* **289**(5488): 2350-4.
- Lee, J. W., Y. H. Soung, S. Y. Kim, et al. (2004). Inactivating mutations of proapoptotic Bad gene in human colon cancers. *Carcinogenesis* **25**(8): 1371-6.
- Lee, J. W., Y. H. Soung, S. Y. Kim, et al. (2006). Absence of BH3 domain mutations in the proapoptotic Bcl-2 gene family in non-Hodgkin lymphomas. *Acta Haematol* **116**(3): 213-5.
- Lenz, G., R. E. Davis, V. N. Ngo, et al. (2008). Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science* **319**(5870): 1676-9.
- Letai, A., M. C. Bassik, L. D. Walensky, et al. (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2**(3): 183-92.
- Limpens, J., D. de Jong, J. H. van Krieken, et al. (1991). Bcl-2/JH rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia. *Oncogene* **6**(12): 2271-6.
- Liu, M., J. L. Duke, D. J. Richter, et al. (2008). Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation. *Nature* **451**(7180): 841-5.
- Liu, Y. J., D. E. Joshua, G. T. Williams, et al. (1989). Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* **342**(6252): 929-31.
- Li-Weber, M. and P. H. Krammer (2003). Function and regulation of the CD95 (APO-1/Fas) ligand in the immune system. *Semin Immunol* **15**(3): 145-57.
- Lossos, I. S., A. A. Alizadeh, M. B. Eisen, et al. (2000). Ongoing immunoglobulin somatic mutation in germinal center B cell-like but not in activated B cell-like diffuse large cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(18): 10209-13.
- Lossos, I. S., Y. Jacobs, M. L. Cleary and R. Levy (2001). Re: Akasaka, H., et al., Molecular anatomy of BCL6 translocations revealed by long-distance polymerase chain reaction-based assays. *Cancer Res.*, 60: 2335-2341, 2000. *Cancer Res* **61**(19): 7363-4.
- Ma, Y., U. Pannicke, K. Schwarz and M. R. Lieber (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* **108**(6): 781-94.
- MacLennan, I. C. (1994). Germinal centers. *Annu Rev Immunol* **12**: 117-39.
- Mader, A., S. Bruderlein, S. Wegener, et al. (2007). U-HO1, a new cell line derived from a primary refractory classical Hodgkin lymphoma. *Cytogenet Genome Res* **119**(3-4): 204-10.
- Maggio, E. M., E. Stekelburg, A. Van den Berg and S. Poppema (2001). TP53 gene mutations in Hodgkin lymphoma are infrequent and not associated with absence of Epstein-Barr virus. *Int J Cancer* **94**(1): 60-6.
- Maggio, E. M., A. Van Den Berg, D. de Jong, et al. (2003). Low frequency of FAS mutations in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol* **162**(1): 29-35.
- Mancao, C. and W. Hammerschmidt (2007). Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A is a B-cell receptor mimic and essential for B-cell survival. *Blood* **110**(10): 3715-21.
- Marafioti, T., M. Hummel, I. Anagnostopoulos, et al. (1997). Origin of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease from a clonal expansion of highly mutated germinal-center B cells. *N Engl J Med* **337**(7): 453-8.
- Marsden, V. S. and A. Strasser (2003). Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annu Rev Immunol* **21**: 71-105.
- Martin, D. A., L. Zheng, R. M. Siegel, et al. (1999). Defective CD95/APO-1/Fas signal complex formation in the human autoimmune lymphoproliferative syndrome, type Ia. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**(8): 4552-7.
- Martin-Subero, J. I., S. Gesk, L. Harder, et al. (2002). Recurrent involvement of the REL and BCL11A loci in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* **99**(4): 1474-7.
- Martin-Subero, J. I., W. Klapper, A. Sotnikova, et al. (2006). Chromosomal breakpoints affecting immunoglobulin loci are recurrent in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma. *Cancer Res* **66**(21): 10332-8.

- Mathas, S., M. Hinz, I. Anagnostopoulos, et al. (2002). Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappa B. *Embo J* **21**(15): 4104-13.
- Mathas, S., A. Lietz, I. Anagnostopoulos, et al. (2004). c-FLIP mediates resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg cells to death receptor-induced apoptosis. *J Exp Med* **199**(8): 1041-52.
- McBlane, J. F., D. C. van Gent, D. A. Ramsden, et al. (1995). Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell* **83**(3): 387-95.
- McDonnell, T. J., N. Deane, F. M. Platt, et al. (1989). bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* **57**(1): 79-88.
- Meggetto, F., C. Muller, S. Henry, et al. (1996). Epstein-Barr virus (EBV)-associated lymphoproliferations in severe combined immunodeficient mice transplanted with Hodgkin's disease lymph nodes: implications of EBV-positive bystander B lymphocytes rather than EBV-infected Reed-Sternberg cells. *Blood* **87**(6): 2435-42.
- Meijerink, J. P., E. J. Mensink, K. Wang, et al. (1998). Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. *Blood* **91**(8): 2991-7.
- Melzner, I., A. J. Bucur, S. Brüderlein, et al. (2005). Biallelic mutation of SOCS-1 impairs JAK2 degradation and sustains phospho-JAK2 action in the MedB-1 mediastinal lymphoma line. *Blood* **105**(6): 2535-42.
- Metkar, S. S., K. N. Naresh, A. A. Redkar, et al. (1999). Expression of Fas and Fas ligand in Hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma* **33**(5-6): 521-30.
- Montesinos-Rongen, M., A. Roers, R. Küppers, et al. (1999). Mutation of the p53 gene is not a typical feature of Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Blood* **94**(5): 1755-60.
- Monti, S., K. J. Savage, J. L. Kutok, et al. (2005). Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. *Blood* **105**(5): 1851-61.
- Mottok, A., C. Renne, K. Willenbrock, et al. (2007). Somatic hypermutation of SOCS1 in lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma is accompanied by high JAK2 expression and activation of STAT6. *Blood* **110**(9): 3387-90.
- Muramatsu, M., K. Kinoshita, S. Fagarasan, et al. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* **102**(5): 553-63.
- Muris, J. J., C. J. Meijer, W. Vos, et al. (2006). Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *J Pathol* **208**(5): 714-23.
- Müschen, M., K. Rajewsky, A. Bräuninger, et al. (2000b). Rare occurrence of classical Hodgkin's disease as a T cell lymphoma. *J Exp Med* **191**(2): 387-94.
- Müschen, M., K. Rajewsky, M. Kronke and R. Küppers (2002). The origin of CD95-gene mutations in B-cell lymphoma. *Trends Immunol* **23**(2): 75-80.
- Müschen, M., D. Re, B. Betz, et al. (2001). Resistance to CD95-mediated apoptosis in breast cancer is not due to somatic mutation of the CD95 gene. *Int J Cancer* **92**(2): 309-10.
- Müschen, M., D. Re, A. Bräuninger, et al. (2000a). Somatic mutations of the CD95 gene in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Cancer Res* **60**(20): 5640-3.
- Novak, U., A. Rinaldi, I. Kwee, et al. (2008). The NF-kB pathway component A20 (TNFAIP3) is commonly inactivated by DNA mutations and deletions in extranodal marginal zone B-cell lymphoma (EMZL). *Ann Oncol* **19**(Supplement 4).
- Offit, K., D. C. Louie, N. Z. Parsa, et al. (1994). Clinical and morphologic features of B-cell small lymphocytic lymphoma with del(6)(q21q23). *Blood* **83**(9): 2611-8.
- O'Reilly, S. M. and P. N. Moynagh (2003). Regulation of Toll-like receptor 4 signalling by A20 zinc finger protein. *Biochem Biophys Res Commun* **303**(2): 586-93.
- O'Shea, J. J. and P. J. Murray (2008). Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity* **28**(4): 477-87.
- Oudejans, J. J., J. A. Kummer, M. Jiwa, et al. (1996). Granzyme B expression in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Am J Pathol* **148**(1): 233-40.
- Pasqualucci, L., G. Bhagat, M. Jankovic, et al. (2008). AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis. *Nat Genet* **40**(1): 108-12.
- Pasqualucci, L., M. Compagno, J. Houldsworth, et al. (2006). Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med* **203**(2): 311-7.
- Pasqualucci, L., M. Compagno, W. Lim, et al. (2008). Derugulation of the NF-kB pathway by oncogenic lesions in ABC-DLBCL. *Ann Oncol* **19**(Supplement 4).
- Pasqualucci, L., P. Neumeister, T. Goossens, et al. (2001). Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* **412**(6844): 341-6.
- Phan, R. T. and R. Dalla-Favera (2004). The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* **432**(7017): 635-9.
- Phan, R. T., M. Saito, K. Basso, et al. (2005). BCL6 interacts with the transcription factor Miz-1 to suppress the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 and cell cycle arrest in germinal center B cells. *Nat Immunol* **6**(10): 1054-60.
- Phan, R. T., M. Saito, Y. Kitagawa, et al. (2007). Genotoxic stress regulates expression of the proto-oncogene Bcl6 in germinal center B cells. *Nat Immunol* **8**(10): 1132-9.
- Pinto, A., D. Aldinucci, A. Gloghini, et al. (1996). Human eosinophils express functional CD30 ligand and stimulate proliferation of a Hodgkin's disease cell line. *Blood* **88**(9): 3299-305.
- Radtke, F., A. Wilson and H. R. MacDonald (2004). Notch signaling in T- and B-cell development. *Curr Opin Immunol* **16**(2): 174-9.
- Rajewsky, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* **381**(6585): 751-8.
- Ramiro, A. R., M. Jankovic, T. Eisenreich, et al. (2004). AID is required for c-myc/IgH chromosome translocations in vivo. *Cell* **118**(4): 431-8.
- Ramiro, A. R., P. Stavropoulos, M. Jankovic and M. C. Nussenzweig (2003). Transcription enhances AID-mediated cytidine deamination by exposing single-stranded DNA on the non-template strand. *Nat Immunol* **4**(5): 452-6.
- Ranger, A. M., J. Zha, H. Harada, et al. (2003). Bad-deficient mice develop diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(16): 9324-9.

- Re, D., A. Hofmann, J. Wolf, et al. (2000). Cultivated H-RS cells are resistant to CD95L-mediated apoptosis despite expression of wild-type CD95. *Exp Hematol* **28**(3): 348.
- Re, D., M. Müschen, T. Ahmadi, et al. (2001). Oct-2 and Bob-1 deficiency in Hodgkin and Reed Sternberg cells. *Cancer Res* **61**(5): 2080-4.
- Renne, C., J. I. Martin-Subero, M. Eickernjager, et al. (2006). Aberrant expression of ID2, a suppressor of B-cell-specific gene expression, in Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol* **169**(2): 655-64.
- Renne, C., J. I. Martin-Subero, M. L. Hansmann and R. Siebert (2005). Molecular cytogenetic analyses of immunoglobulin loci in nodular lymphocyte predominant Hodgkin's lymphoma reveal a recurrent IGH-BCL6 juxtaposition. *J Mol Diagn* **7**(3): 352-6.
- Revy, P., T. Muto, Y. Levy, et al. (2000). Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* **102**(5): 565-75.
- Rogozin, I. B. and M. Diaz (2004). Cutting edge: DGYW/WRCH is a better predictor of mutability at G:C bases in Ig hypermutation than the widely accepted RGYW/WRCY motif and probably reflects a two-step activation-induced cytidine deaminase-triggered process. *J Immunol* **172**(6): 3382-4.
- Rosdahl, N., S. O. Larsen and J. Clemmesen (1974). Hodgkin's disease in patients with previous infectious mononucleosis: 30 years' experience. *Br Med J* **2**(5913): 253-6.
- Rosenquist, R., F. Menestrina, M. Lestani, et al. (2004a). Indications for peripheral light-chain revision and somatic hypermutation without a functional B-cell receptor in precursors of a composite diffuse large B-cell and Hodgkin's lymphoma. *Lab Invest* **84**(2): 253-62.
- Rosenwald, A., G. Wright, W. C. Chan, et al. (2002). The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* **346**(25): 1937-47.
- Rosenwald, A., G. Wright, K. Leroy, et al. (2003). Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med* **198**(6): 851-62.
- Ross, C. W., P. D. Ouillette, C. M. Saddler, et al. (2007). Comprehensive analysis of copy number and allele status identifies multiple chromosome defects underlying follicular lymphoma pathogenesis. *Clin Cancer Res* **13**(16): 4777-85.
- Rubio-Moscardo, F., J. Climent, R. Siebert, et al. (2005). Mantle-cell lymphoma genotypes identified with CGH to BAC microarrays define a leukemic subgroup of disease and predict patient outcome. *Blood* **105**(11): 4445-54.
- Sandlund, J. T., L. M. Neckers, H. E. Schneller, et al. (1993). Theophylline induced differentiation provides direct evidence for the deregulation of c-myc in Burkitt's lymphoma and suggests participation of immunoglobulin enhancer sequences. *Cancer Res* **53**(1): 127-32.
- Satterwhite, E., T. Sonoki, T. G. Willis, et al. (2001). The BCL11 gene family: involvement of BCL11A in lymphoid malignancies. *Blood* **98**(12): 3413-20.
- Savage, K. J., S. Monti, J. L. Kutok, et al. (2003). The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood* **102**(12): 3871-9.
- Scheeren, F. A., S. A. Diehl, L. A. Smit, et al. (2008). IL-21 is expressed in Hodgkin lymphoma and activates STAT5: evidence that activated STAT5 is required for Hodgkin lymphomagenesis. *Blood* **111**(9): 4706-15.
- Schrader, C. E., E. K. Linehan, S. N. Mochevova, et al. (2005). Inducible DNA breaks in Ig S regions are dependent on AID and UNG. *J Exp Med* **202**(4): 561-8.
- Schwaenen, C., M. Nessling, S. Wessendorf, et al. (2004). Automated array-based genomic profiling in chronic lymphocytic leukemia: development of a clinical tool and discovery of recurrent genomic alterations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(4): 1039-44.
- Schwering, I., A. Bräuninger, U. Klein, et al. (2003). Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* **101**(4): 1505-12.
- Schwicker, T. A., R. L. Lindquist, G. Shakhar, et al. (2007). In vivo imaging of germinal centres reveals a dynamic open structure. *Nature* **446**(7131): 83-7.
- Seitz, V., M. Hummel, T. Marafioti, et al. (2000). Detection of clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangements in Reed-Sternberg cells of classic Hodgkin disease. *Blood* **95**(10): 3020-4.
- Sen, R. (2006). Control of B lymphocyte apoptosis by the transcription factor NF-kappaB. *Immunity* **25**(6): 871-83.
- Shin, M. S., H. S. Kim, C. S. Kang, et al. (2002). Inactivating mutations of CASP10 gene in non-Hodgkin lymphomas. *Blood* **99**(11): 4094-9.
- Shiramizu, B. and I. Magrath (1990). Localization of breakpoints by polymerase chain reactions in Burkitt's lymphoma with 8;14 translocations. *Blood* **75**(9): 1848-52.
- Showe, L. C., M. Ballantine, K. Nishikura, et al. (1985). Cloning and sequencing of a c-myc oncogene in a Burkitt's lymphoma cell line that is translocated to a germ line alpha switch region. *Mol Cell Biol* **5**(3): 501-9.
- Sjo, L. D., C. B. Poulsen, M. Hansen, et al. (2007). Profiling of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry: identification of prognostic subgroups. *Eur J Haematol* **79**(6): 501-7.
- Skinnider, B. F., A. J. Elia, R. D. Gascoyne, et al. (2002). Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* **99**(2): 618-26.
- Skinnider, B. F., A. J. Elia, R. D. Gascoyne, et al. (2001). Interleukin 13 and interleukin 13 receptor are frequently expressed by Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* **97**(1): 250-5.
- Song, X. T., K. Evel-Kabler, L. Shen, et al. (2008). A20 is an antigen presentation attenuator, and its inhibition overcomes regulatory T cell-mediated suppression. *Nat Med* **14**(3): 258-65.
- Spets, H., T. Stromberg, P. Georgii-Hemming, et al. (2002). Expression of the bcl-2 family of pro- and anti-apoptotic genes in multiple myeloma and normal plasma cells: regulation during interleukin-6(IL-6)-induced growth and survival. *Eur J Haematol* **69**(2): 76-89.
- Stankovic, T., G. S. Stewart, P. Byrd, et al. (2002). ATM mutations in sporadic lymphoid tumours. *Leuk Lymphoma* **43**(8): 1563-71.

- Stein, H., T. Marafioti, H. D. Foss, et al. (2001). Down-regulation of BOB.1/OBF.1 and Oct2 in classical Hodgkin disease but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease correlates with immunoglobulin transcription. *Blood* **97**(2): 496-501.
- Storb, U., A. Peters, E. Klotz, et al. (1998). Cis-acting sequences that affect somatic hypermutation of Ig genes. *Immunol Rev* **162**: 153-60.
- Straus, S. E., E. S. Jaffe, J. M. Puck, et al. (2001). The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood* **98**(1): 194-200.
- Su, W., J. Spencer and A. C. Wotherspoon (2001). Relative distribution of tumour cells and reactive cells in follicular lymphoma. *J Pathol* **193**(4): 498-504.
- Tagawa, H., M. Suguro, S. Tsuzuki, et al. (2005). Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **106**(5): 1770-7.
- Takahashi, H., F. Feuerhake, S. Monti, et al. (2006). Lack of IKBA coding region mutations in primary mediastinal large B-cell lymphoma and the host response subtype of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **107**(2): 844-5.
- Takahashi, H., K. Hideshima, K. Kawazoe, et al. (1995). Immunophenotypes of Reed-Sternberg cells and their variants: a study of 68 cases of Hodgkin's disease. *Tohoku J Exp Med* **177**(3): 193-211.
- Takahashi, Y., H. Ohta and T. Takemori (2001). Fas is required for clonal selection in germinal centers and the subsequent establishment of the memory B cell repertoire. *Immunity* **14**(2): 181-92.
- Tam, W., M. Gomez, A. Chadburn, et al. (2006). Mutational analysis of PRDM1 indicates a tumor-suppressor role in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* **107**(10): 4090-100.
- Tashiro, J., K. Kinoshita and T. Honjo (2001). Palindromic but not G-rich sequences are targets of class switch recombination. *Int Immunol* **13**(4): 495-505.
- Teng, G. and F. N. Papavasiliou (2007). Immunoglobulin somatic hypermutation. *Annu Rev Genet* **41**: 107-20.
- Thelander, E. F., K. Ichimura, M. Corcoran, et al. (2008). Characterization of 6q deletions in mature B cell lymphomas and childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* **49**(3): 477-87.
- Thomas, R. K., A. Kallenborn, C. Wickenhauser, et al. (2002). Constitutive expression of c-FLIP in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Am J Pathol* **160**(4): 1521-8.
- Tinguely, M., R. Rosenquist, C. Sundstrom, et al. (2003). Analysis of a clonally related mantle cell and Hodgkin lymphoma indicates Epstein-Barr virus infection of a Hodgkin/Reed-Sternberg cell precursor in a germinal center. *Am J Surg Pathol* **27**(11): 1483-8.
- Torlakovic, E., A. Tierens, H. D. Dang and J. Delabie (2001). The transcription factor PU.1, necessary for B-cell development is expressed in lymphocyte predominance, but not classical Hodgkin's disease. *Am J Pathol* **159**(5): 1807-14.
- Traenckner, E. B., H. L. Pahl, T. Henkel, et al. (1995). Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. *Embo J* **14**(12): 2876-83.
- Ushmorov, A., O. Ritz, M. Hummel, et al. (2004). Epigenetic silencing of the immunoglobulin heavy-chain gene in classical Hodgkin lymphoma-derived cell lines contributes to the loss of immunoglobulin expression. *Blood* **104**(10): 3326-34.
- van den Berg, A., L. Visser and S. Poppema (1999). High expression of the CC chemokine TARC in Reed-Sternberg cells. A possible explanation for the characteristic T-cell infiltrate in Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol* **154**(6): 1685-91.
- Volpe, G., U. Vitolo, A. Carbone, et al. (1996). Molecular heterogeneity of B-lineage diffuse large cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* **16**(1): 21-30.
- Wang, D., D. Liebowitz and E. Kieff (1985). An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* **43**(3 Pt 2): 831-40.
- Wang, J., H. J. Chun, W. Wong, et al. (2001). Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**(24): 13884-8.
- Wang, J., L. Zheng, A. Lobito, et al. (1999). Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell* **98**(1): 47-58.
- Weber-Matthiesen, K., J. Deerberg, M. Poetsch, et al. (1995). Numerical chromosome aberrations are present within the CD30+ Hodgkin and Reed-Sternberg cells in 100% of analyzed cases of Hodgkin's disease. *Blood* **86**(4): 1464-8.
- Wei, M. C., W. X. Zong, E. H. Cheng, et al. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**(5517): 727-30.
- Weiss, L. M., R. Warnke, M. L. Hansmann, et al. (2007). Pathology of Hodgkin Lymphoma. Hodgkin Lymphoma. J. O. A. P. M. Mauch, V. Diehl, R. T. Hoppe, and L. M. Weiss. Philadelphia, Lippencott Williams & Wilkins: 43-71.
- Welzel, N., T. Le, R. Marculescu, et al. (2001). Templated nucleotide addition and immunoglobulin JH-gene utilization in t(11;14) junctions: implications for the mechanism of translocation and the origin of mantle cell lymphoma. *Cancer Res* **61**(4): 1629-36.
- Weniger, M. A., S. Gesk, S. Ehrlich, et al. (2007). Gains of REL in primary mediastinal B-cell lymphoma coincide with nuclear accumulation of REL protein. *Genes Chromosomes Cancer* **46**(4): 406-15.
- Weniger, M. A., I. Melzner, C. K. Menz, et al. (2006). Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation. *Oncogene* **25**(18): 2679-84.
- Wertz, I. E., K. M. O'Rourke, H. Zhou, et al. (2004). De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature* **430**(7000): 694-9.
- Wessendorf, S., T. F. Barth, A. Viardot, et al. (2007). Further delineation of chromosomal consensus regions in primary mediastinal B-cell lymphomas: an analysis of 37 tumor samples using high-resolution genomic profiling (array-CGH). *Leukemia* **21**(12): 2463-9.
- Willis, T. G., D. M. Jadayel, M. Q. Du, et al. (1999). Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. *Cell* **96**(1): 35-45.

- Willis, T. G., I. R. Zalcberg, L. J. Coignet, et al. (1998). Molecular cloning of translocation t(1;14)(q21;q32) defines a novel gene (BCL9) at chromosome 1q21. *Blood* **91**(6): 1873-81.
- Wlodarska, I., P. Nooyen, B. Maes, et al. (2003). Frequent occurrence of BCL6 rearrangements in nodular lymphocyte predominance Hodgkin lymphoma but not in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* **101**(2): 706-10.
- Wolf, J., U. Kapp, H. Bohlen, et al. (1996). Peripheral blood mononuclear cells of a patient with advanced Hodgkin's lymphoma give rise to permanently growing Hodgkin-Reed Sternberg cells. *Blood* **87**(8): 3418-28.
- Wright, K. L. and J. P. Ting (2006). Epigenetic regulation of MHC-II and CIITA genes. *Trends Immunol* **27**(9): 405-12.
- Wu, C. J., D. B. Conze, T. Li, et al. (2006). Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation [corrected]. *Nat Cell Biol* **8**(4): 398-406.
- Wuerffel, R. A., J. Du, R. J. Thompson and A. L. Kenter (1997). Ig Sgamma3 DNA-specific double strand breaks are induced in mitogen-activated B cells and are implicated in switch recombination. *J Immunol* **159**(9): 4139-44.
- Xerri, L., E. Devilard, R. Bouabdallah, et al. (1999). Quantitative analysis detects ubiquitous expression of apoptotic regulators in B cell non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia* **13**(10): 1548-53.
- Ye, B. H., S. Chaganti, C. C. Chang, et al. (1995). Chromosomal translocations cause deregulated BCL6 expression by promoter substitution in B cell lymphoma. *Embo J* **14**(24): 6209-17.
- Yokota, Y., S. Mori, O. Narumi and K. Kitajima (2001). In vivo function of a differentiation inhibitor, Id2. *IUBMB Life* **51**(4): 207-14.
- Yoshida, S., Y. Kaneita, Y. Aoki, et al. (1999). Identification of heterologous translocation partner genes fused to the BCL6 gene in diffuse large B-cell lymphomas: 5'-RACE and LA - PCR analyses of biopsy samples. *Oncogene* **18**(56): 7994-9.
- Yu, K., D. Roy, M. Bayramyan, et al. (2005). Fine-structure analysis of activation-induced deaminase accessibility to class switch region R-loops. *Mol Cell Biol* **25**(5): 1730-6.
- Zarrin, A. A., C. Del Vecchio, E. Tseng, et al. (2007). Antibody class switching mediated by yeast endonuclease-generated DNA breaks. *Science* **315**(5810): 377-81.
- Zhang, J., A. Bottaro, S. Li, et al. (1993). A selective defect in IgG2b switching as a result of targeted mutation of the I gamma 2b promoter and exon. *Embo J* **12**(9): 3529-37.
- Zhang, Y., P. Matthiesen, S. Harder, et al. (2000). A 3-cM commonly deleted region in 6q21 in leukemias and lymphomas delineated by fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* **27**(1): 52-8.
- Zhang, Y., K. Weber-Matthiesen, R. Siebert, et al. (1997). Frequent deletions of 6q23-24 in B-cell non-Hodgkin's lymphomas detected by fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* **18**(4): 310-3.
- Zinkel, S. S., C. C. Ong, D. O. Ferguson, et al. (2003). Proapoptotic BID is required for myeloid homeostasis and tumor suppression. *Genes Dev* **17**(2): 229-39.
- Zoldan, M. C., G. Inghirami, Y. Masuda, et al. (1996). Large-cell variants of mantle cell lymphoma: cytologic characteristics and p53 anomalies may predict poor outcome. *Br J Haematol* **93**(2): 475-86.

Teilpublikationen (ausschließlich Primärliteratur):

Thomas R., Wickenhauser C., Tawadros S., Diehl V., Küppers R., Wolf J., Schmitz R.
Mutational analysis of the IkappaBalpha gene in activated B cell-like diffuse large B-cell lymphoma.

Br J Haematol 2004; **126**(1):50-4

Thomas R., Schmitz R., Harttrampf A., Abdil-Hadi A., Wickenhauser C., Distler V.,
Hansmann M.-L., Schultze J., Küppers R., Wolf J.
Apoptosis-resistant phenotype of classical Hodgkin's lymphoma is not mediated by somatic mutations within genes encoding members of the death-inducing signaling complex (DISC).
Leukemia 2005;**19**(6):1079-82

R.T. und R.S. teilen eine gemeinsame Koerstautorenschaft

Schmitz R., Renné C., Rosenquist R., Tinguely M., Distler V., Menestrina F., Lestani M.,
Stankovic T., Austen B., Bräuninger A., Hansmann M.-L., Küppers R.
Insights into the multistep transformation process of lymphomas: IgH-associated translocations and tumor suppressor gene mutations in clonally related composite Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas.

Leukemia 2005; **19**(8):1452-8

R.S. C.R. und R.R. teilen eine Koerstautoenschaft

Schmitz R., Thomas R., Harttrampf A., Wickenhauser C., Schultze J., Hansmann M.-L., Wolf J., Küppers R.

The major subtypes of human B-cell lymphomas lack mutations in BCL-2 family member BAD.

Int J Cancer 2006; **119**(7):1738-40

R.S. und R.T. teilen eine gemeinsame Koerstautorenschaft

Schmitz R., Hansmann M.-L., Martin-Subero I., Bohle V., Hartmann S., Mechttersheimer G., Klapper W., Stanelle J., Siebert R., Küppers R.

TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma

Eingereicht

Einige der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurden in enger Zusammenarbeit mit verschiedenen Kooperationsgruppen erzielt. Hierauf wird bei der Vorstellung der Ergebnisse an den entsprechenden Stellen hingewiesen.